

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Potenciales bioelectricos en el callo de fractura y su  
correlación histológica : estudio experimental**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Luis López-Durán Stern**

DIRECTOR:

**Hipólito Durán Sacristán**

**Madrid, 2015**

POTENCIALES BIOELECTRICOS EN  
EL CALLO DE FRACTURA  
SU CORRELACION HISTOLOGICA

(ESTUDIO EXPERIMENTAL)

TOMO - I

## S U M A R I O

## S U M A R I O

	página
Introducción .....	1
Revisión de la literatura .....	6
1 - Células	
Osteoblastos .....	6
Osteocitos .....	12
Osteoclastos .....	21
2 - Matriz ósea	
Sustancia fundamental .....	25
Mucopolisacáridos ácidos .....	29
Las glicoproteínas .....	33
Colágeno .....	40
Calcificación .....	61
Mineral .....	79
El callo de fractura .....	91
Hemorragia .....	92
Inflamación .....	95
Hematoma .....	101
Callo periostal .....	105
Callo medular .....	119
Vascularización .....	122
Cartílago .....	132
Factores mecánicos .....	137
Fenómenos eléctricos .....	147
Hipótesis de trabajo .....	178
Material y métodos.....	179



A MIS PADRES

Señores:

A lo largo de los cinco años que nos ha costado la realiza  
ción de esta tesis, hemos podido apreciar claramente, no por mani-  
da menos real, la dificultad existente en nuestro país para el de-  
sarrollo de un trabajo de investigación experimental que quiera te  
ner el menor grado de honestidad científica tolerable.

Dificultades que se acrecentan para los clínicos cuando en  
tran en el terreno de las ciencias básicas, al tener que aprender  
una nueva metodología desde cero y revisar temas que se alejan apa  
rentemente de su práctica diaria, aunque constituyen su fundamento  
real.

Pero no es éste lugar para lamentaciones, sino para rendir  
tributo a todos aquellos sin cuya ayuda no hubiera sido posible la  
realización de esta tesis, al ser al final ésta una labor colecti-  
va.

En primer lugar hemos de citar al Profesor D. Hipólito Du-  
rán Sacristán, director de esta tesis, junto a quién he desarrolla  
do toda mi vida universitaria. El Profesor Durán ha sabido, a lo  
largo de estos años, encarrilarme con sus consejos a la consecu-  
ción de la tesis, liberándome de más de una obligación diaria y re  
cordándome de forma constante la necesidad perentoria de llevar a  
buen término esta labor.

Al Profesor D. Antonio Gallego Fernández debo la posibili-  
dad de haber realizado dignamente este trabajo al poner a mi dispo-  
sición sus consejos y análisis críticos de los datos obtenidos, -

exigiéndome una actividad reglada a lo largo del experimento, cuyas bases materiales me proporcionó asimismo, junto con la ayuda - de sus colaboradores.

De estos, recordaré a D. Antonio Lafuente cuya ayuda técnica en la fabricación de los electrodos, y su consejo diario a lo largo del tiempo que duró la fase experimental manteniéndome siempre en la vía previamente fijada, ha sido de un valor inapreciable. Además, la colaboración del Dr.D. Javier Yageya, y a última hora - de la Dra. Comas, me facilitaron grandemente el manejo de los animales.

He de mencionar asimismo al Profesor D. Agustín Bullón Ramírez, quién me colocó junto a los Dres. Merchan y Furió los cua - les me guiaron en la interpretación de los hallazgos morfológicos.

Por último he de citar a todos mis compañeros del Servicio del Profesor D. Hipólito Durán, y en especial al Dr. Alarcón, quie - nes me suplieron a lo laro de estos años en el trabajo diario más de una vez.

He de señalar aparte a la Srta. Concepción Sánchez, quién ha realizado materialmente, con un espíritu de perfección y una -- conciencia de trabajo inusual, la labor que aquí presento, en - cuya primera fase colaboró, sacando tiempo al tiempo, Carmen Díez y Jaime Viani que ha desarrollado una labor fotográfica ingente - para que pudiera obtener las imágenes aquí recogidas.

Mi familia toda ella, y en especial mi mujer y mi hija sa-

ben lo que les debo por lo cual no los mencionaremos más.

Para concluir recordaré aquellos amigos que desde la ado -  
lescencia consideraron que el intento de una creatividad científí-  
ca debía ser la labor princeps de mi vida.

A todos, muchas gracias.

## I N T R O D U C C I O N

## I N T R O D U C C I O N

Hemos elegido el tema del callo de fractura como Tesis Doctoral, ya que, su estudio sigue planteando gran número de problemas a pesar de ser, - si se quiere, una de las cuestiones más clásicas en el estudio de la fisiopatología ósea que, tanto en su descripción como en su interpretación, va - cambiando con el tiempo a medida que cambian los conocimientos y las teorías en uso sobre la fisiología ósea.

El estudio de las fracturas puede enfocarse desde muy diversos puntos de vista, según lo contemplemos desde su faceta social o desde la bio - química.

Desde un punto de vista social las fracturas son un fenómeno patoló gico que aparece con una frecuencia creciente, lo que podemos considerar de bido a varios factores tales como:

- 1.- Un mayor número de personas con ocupación laboral industrial - con un mayor riesgo traumático.
- 2.- Un aumento del parque móvil de los países a medida que crece - su renta, con lo que el riesgo de accidente viario aumenta mucho.

Una mayor frecuencia de los viajes, que favorece también los - accidentes por otros medios de locomoción como es el ferroca - rril.

Así, y según De Anquin, en el año 1969 se producían 1000 muer - tos diarios por accidente de circulación en el mundo. Kunts - cher, señala en su libro que en el año 1960 hubo 13.900 muer - tos por tráfico en Alemania. Para nuestro país, Palacios ( según datos de la Jefatura Central de Tráfico), señalaba como - muertos en las 24 horas una cifra de  $1,189 \times 10^7$ /Km. y para el - año 1966 por cada 1000 vehículos 1,533 muertos y 26,347 heri - dos, con un total de 3287 accidentes. Pero esto no es unifor -

me, y tiene interés analizar el número de politraumatizados atendidos en los diferentes servicios que a ello se dedican, según el desarrollo del país. Monticelli en Roma, entre 1962 y 1965 encuentra 199 muertos entre 18.972 accidentes atendidos. De Marneffe, entre 1962 y 1969, recoge 372 politraumatizados, en tanto que Silva en -- Singapur, entre 1967 y 1969, recoge 477 casos sin señalar el período de tiempo durante el cual se extiende dicha revisión (1,2,7-9,11, 12)

- 3.- Mayor sobrevida del enfermo canceroso con una gran frecuencia de -- aparición de metástasis óseas, que determinan una mayor abundancia de fracturas, ya que, por el mejor estado general que presentan hoy estos enfermos y su aumentada sobrevida, exigen un tratamiento de -- dichas lesiones. Por ello encontramos cada vez más referencias sobre el tema en la literatura especializada, de forma que Katzner -- describe 33 y Dossa 40 fracturas patológicas tratadas con buen re -- sultado en enfermos de este tipo (3,6).

Vemos, pues, que el número absoluto de fracturas va en la actualidad en -- aumento y plantea una serie de problemas que exigen una solución. Estos problemas se pueden enfocar desde varias vertientes:

I) En su aspecto económico-social, ya que, por un lado determina una elevada -- pérdida de horas de trabajo debido a la lentitud con que curan estas lesiones. -- Pérdida del rendimiento laboral que incide desfavorablemente en el proceso de -- producción, lo que en países de estructura capitalista en especial, lleva al desarrollo de técnicas que permitan una más rápida y mejor recuperación del lesionado para el trabajo, con un descenso del número de individuos que pasan a la -- clase pasiva y se convierten en una carga económica para esa sociedad. (10,13).

II) Desde el punto de vista bioquímico, en el estudio del hueso y su fisiología encontramos una gran dificultad al tratarse de un tejido cuya sustancia fundamen tal está calcificada y entorrece, por tanto, el análisis de las funciones celula res, que hasta hace relativamente poco no eran conocidas.

El hueso es un tejido conjuntivo especializado que cumple dentro del organismo dos funciones: por un lado una química, de reservorio de iones im prescindibles para el mantenimiento del medio interno como son el calcio, - fósforo, magnesio y, en menor grado, el sodio y el potasio. Por otro lado - cumple una función mecánica de sostén formando el esqueleto. Ambas misiones dependen de la sustancia fundamental calcificada que actúa de depósito y de base mecánica rígida.

La función bioquímica se puede estudiar a nivel del hueso como tejido. Por el contrario la función mecánica la podemos encarar de dos maneras: por un lado a nivel de tejido, también como hueso en general, manifestando - unas características determinadas y por otro a nivel de órgano concreto de la economía, con una forma particular, y de acuerdo con ella y con el lugar que ocupa en el esqueleto, está sometido a unas sollicitaciones mecánicas da das a las que ha de adecuarse.

En la actualidad sabemos, desde que iniciara los estudios del hueso Duhamel en 1740, que el mismo no es un tejido inerte, sino que está sometido a unos cambios constantes debidos a su actividad celular. (4)

Por ello, en su estudio nos encontramos con varios elementos a consi derar:

1) Como tejido conjuntivo contará con unas células, unas fibras y - una sustancia fundamental, que al estar calcificada exigirá el conocimiento del mineral depositado, la relación entre los diferentes elementos de este - tejido y la función rectora de las células; la osteogénesis y la reabsorción ósea.

2) El estudio de las dos funciones antes señaladas, la bioquímica - y la mecánica y las señales particulares de cada una de estas funciones que determinarán una respuesta ósea.

Las señales a las que es sensible el hueso pueden considerarse en un



principio diferentes para su misión de depósito y para la de sostén.

A nivel de tejido propiamente dicho podemos asumir en una primera hipótesis que la respuesta celular es unitaria, en el sentido que, aunque los estímulos sean diferentes, la capacidad de respuesta celular es limitada al tratarse de células especializadas dentro de un organismo pluricelular. Este número limitado de respuestas se podrá combinar entre sí en el tiempo y en el espacio para dar una solución integrada, más compleja, a los estímulos a los que son sometidas dichas células y teniendo en cuenta, además, los diferentes tipos celulares que pueden combinarse para cumplir dicha función.

Así, anticipándonos a lo que vamos a estudiar algo más detenidamente a continuación, si una respuesta es la reabsorción y otra el depósito mineral, estas podrán hacerse al azar dentro de toda la masa ósea si responden a un estímulo bioquímico; pero se orientarán en el espacio y aparecerán en lugares determinados de los huesos como estructuras concretas, de acuerdo a sus sollicitaciones mecánicas.

Los estímulos bioquímicos que dan lugar a una respuesta de depósito o reabsorción ósea se conocen en la actualidad bastante bien, son de naturaleza hormonal y hemos de considerar como señales la paratohormona, la calcitonina y las formas activas de la vitamina D, el 1,25 OH colicalciferol.

La naturaleza y función de los estímulos mecánicos y su acción sobre la estructura, han estado sometidos durante mucho tiempo a polémica - en el sentido de aceptar que los mismos puedan alterar la estructura del hueso; pero no su forma que está condicionada genéticamente. Si aceptamos que los estímulos mecánicos elementales (compresión, tracción y cizalla) determinan la estructura ósea, deberemos averiguar como determinan una respuesta celular coordinada y congruente con dicho estímulo.

Desde los trabajos de Yamada y Yashuda se conocen las propiedades

piezoeléctricas del hueso y se acepta por lo general que los micropotenciales, así generados, son las señales que condicionan la respuesta celular - a los estímulos mecánicos. Pero estos no son los únicos potenciales que se han detectado a nivel óseo, Friedenberg, etc., han demostrado potenciales en reposo, que se modifican tras la producción de fracturas, y que no tienen que ver en principio con los de origen piezoeléctrico.

Ante estos datos, no totalmente concordantes entre sí, intentamos - en este estudio analizar los potenciales óseos de reposo, la influencia del sistema nervioso sobre ellos y su variación tras la fractura desde el momento de su producción hasta la consolidación de la misma, correlacionándolos - con la evolución histológica del callo. Hemos elegido esta forma de enfocar el problema por considerar que durante la reparación fracturaria la respuesta celular no puede estar condicionada por potenciales piezoeléctricos, ya que, la unidad mecánica del hueso está perdida y no se recupera una estabilidad suficiente hasta muy avanzado el callo. La crítica que se puede hacer a este planteamiento es que el estímulo para el proceso cicatrizal, no es de origen eléctrico y que los potenciales piezoeléctricos son únicamente responsables de los remodelamientos óseos secundarios.

El estudio histológico busca dos fines:

- 1.- Control morfológico del callo y su evolución.
- 2.- Confrontar los hallazgos obtenidos con los datos señalados por otros autores en las respuestas a estímulos hormonales y comprobar la posibilidad antes enunciada de una respuesta celular unitaria frente a diferentes estímulos.

Haremos en primer lugar una revisión de los puntos de la fisiología ósea que más nos interesan.

## R E V I S I O N D E L A L I T E R A T U R A

### I - C E L U L A S

El Osteoblasto

Osteocitos

Osteoclastos

## REVISION DE LA LITERATURA

El hueso como tejido conjuntivo aparece formado a partir de unas células mesenquimales llamadas osteoblastos, que se rodean de una sustancia fundamental rica en fibras colágenas denominada osteoide, que al calcificarse se transforma en hueso e incluye en su interior a los osteoblastos, que se convierten así en osteocitos, células estrelladas con prolongaciones que, a través de los canalículos abiertos en la sustancia fundamental mineralizada, comunican unos con otros estableciendo contactos entre sí con los osteoblastos de la superficie, así como, con los vasos encargados de nutrir estas células que aparecen a intervalos regulares. En otros puntos el tejido óseo es reabsorbido, también por células, denominadas osteoclastos, que actúan originando unas zonas de contornos nítidos - conocidas como lagunas de Howship.

Vamos a comenzar considerando primero todos los componentes del hueso como tejido, haciendo una primera aproximación estática y por lo -- tanto inexacta. Describiremos sus particularidades histológicas sin preocuparnos, en un principio, de su origen y devenir, así como de su función ( lo cuál haremos en una segunda parte tras la descripción morfológica).

### 1 .- C E L U L A S

El Osteoblasto .- Una de las principales dificultades con la que nos encontramos es la definición de qué es un osteoblasto, y siguiendo a Bordier (45) sólo vamos a considerar como tales las células activas, - formadoras de hueso, capaces de producir colágeno y de calcificarlo. Aunque Goodsir, Tomes y Morgan y Mueller habían descrito antes estas células, fue Gegenbauer en 1864 quién consideró estas células del periostio como las productoras de hueso y, por tanto, responsables de la reparación ósea llamándolas osteoblastos. ( 31, 43 )

Los osteoblastos activos miden entre 15 y 80 micras de diámetro, con un tamaño medio entre las 20 y 30 micras. Aparecen sobre las superficies - donde se forma hueso, en una capa celular continua con una disposición seudoepitelial. Presentan uniones entre las células de forma discontinua tomando una distribución endotelial, como han demostrado Doty y Schoffield - ( 23 ) y Mathews (39.50). En los puntos de gran actividad formadora los osteoblastos parecen estratificarse, toman una disposición oblicua y se imbrican los unos con los otros como las tejas; pero en general forman un estrato en empalizada unicelular directamente sobrepuestos al hueso. Estas células presentan un aspecto prismático, piriforme, con un diámetro mayor de 20 a 30 micras. El núcleo en las zonas de formación activa de hueso se encuentra alejado de esta superficie, es decir, muestra una polaridad negativa, - es grande, ovoideo, en general pobre en cromatina y con 1-3 nucleolos, que según Cappellin son más intensos durante la fase de formación de osteoide - para desaparecer en el momento que el osteoblasto queda englobado convirtiéndose en osteocito. El núcleo tiene 2 membranas y poros escasos. Cameron - describe el acúmulo de material nuclear en torno a los poros. ( 17, 20, 44 )

Aunque Novikoff y Krompecher ( 300 ) piensan en la posibilidad de divisiones amitóticas de los osteoblastos, Weidenreich y Pritchard (42,51)-- afirman que estas células no se dividen, lo que confirman los trabajos de Owen y Tonna, Scott y Remagen ( 46,49), con timidina tritiada, los cuales - afirman que estas células en fase de osteoblasto no se dividen, sino que - preceden de otras precursoras que se denominan en general preosteoblastos , que son los que, según Manabe (318) 1975, muestran una actividad divisoria al margen de la célula mesenquimal indiferenciada. Dicho autor indica la existencia de una división de los osteoblastos; pero creemos que se refiere a las células intermedias denominadas en la actualidad preosteoblas - tos, situadas entre la célula mesenquimal indiferenciada, de la que más tarde hablaremos, y el osteoblasto propiamente dicho, directamente superpuesto sobre la superficie osteoide y encargado de su producción. Los núcleos de los osteoblastos se tiñen someramente con el Feulgen, lo que indica su escaso contenido en A.D.N. y apoyaría, así mismo, la falta de división mitótica de los mismos antes postulada. ( 14, 18, 20, 24, 26, 37, 40, 45, 53 )

El citoplasma muestra por el contrario una marcada basofilia que es una de las más intensas de la economía. Con el azul de metileno se tiñe - el citoplasma por entero, con excepción de una zona en torno al núcleo que se conoce como vacuola yuxtannuclear y que corresponde al aparato de Golgi. La basofilia es más intensa en las células de actividad y desaparece en lo que alguno de los autores consideran como osteoblastos en reposo, es decir, las células de la superficie ósea que no están en fase de síntesis, así como en los osteocitos. El citoplasma con la histología ordinaria parece finamente granulado.

La basofilia del citoplasma indica una intensa actividad del A.R.N. ya que esta tinción se pierde si se trata el hueso con ribo-nucleasas y, - según Gaillard (28) , es índice de una elevada síntesis proteica. Capellin señala que en el embrión de pollo la basofilia aparece primero en el nucleolo, del cual pasa al citoplasma colocándose en torno a la membrana - nuclear, para luego dispersarse a todo el citoplasma cuando la célula está totalmente diferenciada y tiene lugar la síntesis de la matriz orgánica - ósea. Esta basofilia, como ya hemos señalado, desaparece cuando la célula se transforma en osteocito, quedando incluida en el material mineralizado. Para Ham, la basofilia se debe a la gran frecuencia de ribosomas unidos al retículo endoplasmático. (29)

El retículo endoplasmático R.E. y los ribosomas, según Bordier (45), son el organito celular más importante de los osteoblastos y explican su - basofilia. El retículo endoplasmático es de la variedad rugosa. Compone el R.E. en una serie de placas o canalículos de membrana doble, con un espacio claro entre ellas y de contenido uniforme, pero de mayor densidad - que el citoplasma. Se dispone en paralelo al polo secretor de la célula - entre éste y el núcleo. En algunas zonas del R.E. se producen expansiones de su luz dándole aspecto de vesículas, lo que según Cameron no está en re- lación con el estado funcional de las células . Según Scott, Benedetti - (15) , etc.. Las vesículas del R.E. están rellenas de un material amorfo denso. ( 14, 17-20 ).

Sobre la cara externa de estas láminas de adhiere un gran número - de ribosomas que, según Cameron ( 20 ), toman una disposición en espiral o en cadena.

En todos los osteoblastos activos se puede observar una zona yuxtannuclear que, como ya hemos señalado antes, no se tiñe con los colorantes - habituales y que Schaffer denominó la vacuola yuxtannuclear. Fell consideró representaba el aparato de Golgi que se había destruido por los fijadores habituales y la llamó imagen negativa del Golgi. Heller dice que sólo aparece en los osteoblastos más grandes y más activos. Con las tinciones metálicas para la microscopía ordinaria, se demuestra que está formado el aparato de Golgi por una retícula de elementos osmiófilos que se hacen más difusos en la fase secretoria, para disminuir de volumen cuando la célula se envuelve en osteoide. Según Fell (26) su estado de mayor o menor com - plexidad refleja el grado de actividad celular y puede observarse la emi - gración de sus vesículas dentro de la célula.

Con el microscopio electrónico se ha visto que el Golgi del osteo - blasto está muy bien definido según Cameron (17), Robinson (47) , y está integrado por una serie de sacos vacíos, por grandes vacuolas y por pe - queñas vesículas. Presenta, a diferencia del retículo endoplasmático de distribución irregular, una disposición organizada en cavidades unidas a - membranas. Parece derivar de otras estructuras membranosas de la célula , así para unos autores se origina de la membrana citoplasmática, y para -- otros del retículo endoplasmático.

Juega el aparato de Golgi un papel fundamental en la secreción celu - lar. Se suele colocar entre el núcleo y el polo secretorio de la célula . Según Ham (29) es un acúmulo de vesículas membranosas lisas, apiñadas - unas sobre otras en la proximidad del núcleo, con disposición arqueada que en su zona convexa se abomban y liberan unas estructuras llamadas vacuolas, cuyo contenido se condensa mientras emigran hacia la superficie celular. - Las membranas del aparato de Golgi, según Ham, se forman a partir del reti - culo endoplasmático, son pequeñas, de superficie lisa y se llaman vesícu -

las de transferencia. Están llenas de proteínas sintetizadas en el R.E., que al pasar al aparato de Golgi maduran. Al llegar a la membrana celular se eliminan las vacuolas descritas, contribuyendo así a la secreción celular. Veremos el papel que juegan en la síntesis del colágeno y su calcificación.

Ya Weidenreich y Dubrueil habían descrito en el interior de estas células la existencia de vesículas que, según Rasmussen, tienen de 200 a 400 Å y según Heller-Steinberg miden de 0,3 a 0,6 micras y son P.A.S. positivas. Con el microscopio electrónico se ha visto que las vesículas -- tienen una membrana única con un contenido de material denso considerado -- por Fitton Jackson como mucosopolisacáridos y proteínas, y su número varía de acuerdo con la actividad secretoria de la célula. (16,21,27,30,51)

Se encuentran también algunos cuerpos considerados como lípidos por Ascenzi. Al contrario que en los preosteoblastos se considera en general que la existencia de glucógeno es escasa; pero con el microscopio electrónico, Scott ha demostrado la existencia de un material finamente granular -- en la periferia de la célula, que interpreta como glucógeno.

Las mitocondrias son los organitos celulares que albergan las cadenas enzimáticas respiratorias, aparecen con una frecuencia relativa, pero no excesiva, y tienen un tamaño aproximado de 0,2 micras. Según Fell, en los osteoblastos grandes y activos aparecen en disposición radial en torno al aparato de Golgi. Esta disposición y su número aumentan desde los -- preosteoblastos hasta los osteoblastos, disminuyendo después cuando la célula se transforma en osteocito. Pritchard, con el M.E. ha confirmado que se acumulan en la periferia celular y que son iguales que las de las demás células del tejido conjuntivo sin mostrar variaciones especiales, es decir, tienen una doble membrana, crestas bien desarrolladas, forma de bastón y -- en ocasión gránulos en su interior.

Por último, se describen en su interior la presencia de microtubos y microfilamentos, siendo mejor conocida la función de los primeros. Taylor (22), en el epitelio de la vejiga, muestra su relación con el trans\_



porte de agua. Parece que su función y número se estimula por el A.M.P. cíclico y Rasmussen señala que intervendrían en el transporte intracelular. - Por otro lado, Ehrlich, etc. (25) han demostrado por estudios con colchicina y vimblastina que los microtubos están en relación con el transporte - de productos del aparato de Golgi al exterior de la célula; y en concreto - para los osteoblastos intervienen en el transporte del procolágeno a la matriz extracelular. ( 16,22,39,50,52 )

Hemos de señalar, como ya dijimos antes, que los osteoblastos presentan prolongaciones citoplasmáticas que entran en contacto de manera aislada con los osteoblastos vecinos, como en un endotelio. Se incluyen en el os-teoide y entran en contacto con los osteocitos de la profundidad a través - de los canales que hay en la matriz calcificada. Para Pritchard (44) - también van a tomar contacto con los preosteoblastos, en tanto que Bordier y Rasmussen ( 45) lo niegan. Según estos autores las prolongaciones de - los osteoblastos contribuyen a formar un sincitio celular que describiremos después. Mathews las considera más frecuentes en los osteoblastos jóvenes, disminuyendo con la edad y tras la administración de cortisona.

Pautard ha descrito con el m. e., en otro tipo de prolongaciones citoplasmáticas, la existencia de cuerpos densos que parecen estar en relación - con el comienzo de la calcificación y las llama extrusiones protoplasmáticas que, según Bonucci, serían distintas de las prolongaciones habituales - de los osteoblastos encargadas de los contactos celulares y que se liberan en forma de vesículas pinocitóticas.

Los osteoblastos, igual que los osteocitos de superficie, pueden modificar su forma de acuerdo a su estado funcional, lo que es especialmente marcado tras la administración de calcitonina, que produce una contracción - de las células aumentando así los espacios entre ellas y produciendo un -- gran acúmulo de Ca y P en el intersticio, como muestran los estudios con piroantimonato de Mathews ( 50) .

### Osteocitos .-

Son las células derivadas de los osteoblastos una vez que quedan en globadas en la sustancia fundamental calcificada, donde sufren una serie - de transformaciones morfológicas y en correspondencia funcionales, que has ta hace relativamente poco tiempo eran mal conocidas y por ello se las con sideraba células de significación funcional muy escasa, se suponía que ter minaban muriendo y dejando, especialmente en el adulto, lagunas vacías que podían hipermineralizarse como ha demostrado Jowsey ( 69 ) .

Los osteocitos son las células más frecuentes del hueso, ya que, - Baud ( 55 ) considera que hay aproximadamente 26.000 por mm<sup>3</sup>. Su frecuencia varía de unas áreas a otras, lo que se debe a la intensidad de la actividad osteoblástica, que varía de unas zonas a otras. Así, en el hueso em brionario aparece un mayor número de osteocitos con una distribución irregular, en tanto que, en el hueso laminar adulto hay menos y están mejor or denados en su distribución, son más alargados y con más procesos citoplasmáticos. El esqueleto joven es más rico en osteocitos que el del adulto. (14)

Los osteocitos no muestran una morfología unitaria, sino que ésta - varía con el tiempo y refleja, según las investigaciones de Baud, Belanger, Vittali, Remagen, Schulz (58,60,79,83), el estado funcional de los mismos que se encuentra en relación con el metabolismo del calcio.

Jande y Belanger consideran tres fases en la vida del osteocito:

- 1) Fase juvenil. Recién incluídos en el hueso aparecen los osteocitos con una estructura muy similar a la de los osteoblastos.
- 2) Osteocito maduro. Presenta una fase activa de reabsorción ósea con un aumento de tamaño en la laguna osteocitaria cuyo borde - osteoide tiene una mayor apetencia basófila en las tinciones - histológicas ordinarias.

- 3) Fase degenerativa. La célula muere dejando la laguna vacía que, como hemos señalado, se puede hipercalcificar, dando una imagen de micropetrosis - según Frost, Jowsey (64,67), etc.. -

En contra de esta teoría hay datos que parecen indicar que el osteocito se recupera y es capaz de sintetizar de nuevo hueso, es la fase llamada por Baud y Vittali (58,84) de osteoplasia. Por otro lado se ha demostrado que la imagen de picnosis se produce, así mismo, tras el estímulo - con calcitonina y representaría, por tanto, un momento de reposo funcional celular, según Rasmussen. Hoy parece aceptarse por la mayoría, que el osteocito tiene una actividad tanto lítica como formadora de hueso, al margen de que pueda degenerar y morir como han demostrado, fuera de toda duda, Jowsey, Jee, Frost (66,68) .

Cuando el osteoblasto queda incluido en la fase mineral y se transforma en osteocito, pierde volumen y emite prolongaciones citoplasmáticas laterales, además de las que ya presentaba como osteoblasto. Prolongaciones que se introducen en los canalículos de la sustancia fundamental mineralizada, poniendo en contacto unos osteocitos con otros y con las células superficiales formando, por tanto, un sincitio.

Las zonas de unión celular son áreas de contacto como los desmosomas epiteliales. Según Holtrop, son regiones de mayor permeabilidad para el paso de iones y proteínas de bajo peso molecular de unas células a -- otras. La formación de este sincitio celular tiene importancia, como describiremos más adelante, para la homeostasis mineral, puesto que, separa la fase mineral ósea del líquido extracelular general. (52)

La membrana del cuerpo celular tiene una morfología diferente según la actividad funcional. Bien aparece plegada mostrando incluso microbellosidades, o bien aparece con estructura lisa. El núcleo de los osteocitos es grande, ocupa una gran parte de la célula y, a veces, tiene un nucleolo y un contenido finamente granuloso. La membrana nuclear es doble.

Los osteocitos jóvenes, llamados osteoides, tienen un retículo endoplásmico rugoso, muy bien desarrollado y con abundantes ribosomas. Hay un aparato de Golgi formado de vesículas y vacuolas. Las mitocondrias son redondas y pequeñas. Aparecen algunos lisosomas. Cuando el osteocito se hace adulto pierde gran cantidad de su retículo endoplásmico, que aparece formado preponderantemente por grandes cisternas. Disminuye bastante el número de ribosomas que, aunque son menos frecuentes que en el osteoblasto, son lo suficientemente abundantes como para hacer aparecer el citoplasma de carácter basófilo en las tinciones para el mic. ordinario. El aparato de Golgi ocupa el mismo puesto que en el osteoblasto, es decir, en la zona yuxtannuclear y está formado, sobre todo, por pilas de membranas y pequeñas vesículas. Las mitocondrias en forma de bastones presentan con frecuencia entre sus crestas gránulos densos de 300 a 500 Å de diámetro, que son similares a los que aparecen en los osteoclastos. Hay, así mismo, glucógeno que, con el microscopio electrónico, aparece en forma de gránulos con una membrana de 200 Å de diámetro y de distribución irregular o asociados en grupos junto a los que se demuestra la existencia de vesículas lipídicas. Todas estas estructuras indican que, aunque más lentamente como ha demostrado Baud (58) con leucina marcada con tritio, estas células sintetizan proteínas y mucopolisacáridos. (55-60,67,78,79,83)

En diversas zonas del hueso los osteocitos adultos muestran una disminución del retículo endoplasmático y un aumento de las mitocondrias que en ocasiones están hinchadas con gránulos densos en su interior. Aparecen en número mayor o menor vesículas lisosómicas que se acompañan de la demostración histoquímica de fosfatasa ácida y otros enzimas proteolíticos (todo ello índice de la actividad lítica de estas células). Ninguno de los organitos celulares descritos, penetra aparentemente en las prolongaciones citoplasmáticas que se distribuyen por los canalículos óseos.

Hemos de describir por fin el último tipo morfológico de osteocito. Este se retrae, tiene un núcleo picnótico y vacuolas autofágicas en su citoplasma. Es lo que Recklinghausen denominó la oncolisis. Clásicamente se ha considerado a estos osteocitos como células muertas o en vías de destrucción; pero ya hemos señalado antes que este mismo estado se produce -

tras la administración de calcitonina, recuperando el osteocito en oncolisis, al cabo de unas horas, su morfología normal. Como señala Mathews son cambios similares a los que se pueden observar en los osteoblastos tras la administración de la misma hormona. ( 22,50,77 )

Debe diferenciarse:

a) células retraídas con verdadera desintegración del núcleo, alteraciones claras en el espacio perilacunar con gran acúmulo de material flocular y desintegración parcial de la lámina osmiófila, vacuolas autofágicas celulares e incluso lisis celular, todo ello índice de una verdadera muerte celular que, según Jande (67) , sucede cerca de las superficies endostales en el hueso en crecimiento y, según Luk y Jee ( 68 ) , en el hueso cortical adulto en las zonas más alejadas de los capilares. Por tanto, podría considerarse la muerte osteocitaria consecuencia de la isquemia.

b) frente a ello están los osteocitos adultos sanos que a los 8 minutos de la administración de calcitonina se retraen conservando el núcleo y el resto de las estructuras celulares en buenas condiciones y, como -- Mathews (22) ha mostrado, se rodean en el espacio lacunar que por la retracción celular ha aumentado mucho de tamaño , de fosfato cálcico. Es un estado transitorio, ya que, estas células recuperan su morfología normal -- al cabo de 2 horas.

En un principio se pensó que el no ocupar los osteocitos plenamente su laguna era un artefacto de técnica, como aún sostiene en la actualidad Jaffe (31) ; pero después se ha visto que es un exponente de su actividad funcional y parece que al llegar la muerte, la célula se retrae ocupando sólo una parte de su laguna.

Entre la membrana celular y la zona completamente mineralizada hay un espacio que en las lagunas de los osteocitos jóvenes es menor, mientras que en los que presentan una actividad reabsortiva es mayor y muestra una estructura determinada.

En las formas jóvenes y adultas normales, el espacio pericelular oscila entre 0,5 y 0,1 micra. Según Remagen (46) se encuentra ocupado por mucopolisacáridos y fibrillas con la estriación típica de colágeno.

1.- En los osteocitos jóvenes en fase formadora, la membrana celular está totalmente en contacto con la pared de la laguna y se diferencia entre la matriz totalmente calcificada y el osteoide directamente en contacto con la membrana celular, una zona de carácter tintorial distinto llamada matriz perilacunar por Wasseman y Yaeger, que tiene unas fibras colágenas más prominentes y mayor cantidad de sustancia fundamental. (86)

En la fase de reabsorción en esta zona, comienza a aparecer un material flocular que termina por ocupar todo el espacio pericelular. Este material flocular está formado por mucopolisacáridos y es un producto de degradación de la matriz. A la vez aparece una lámina osmiófila entre la zona de material flocular y la matriz mineralizada. Por dentro, en la zona de material flocular, aparecen también fibras colágenas de disposición --irregular.

Los osteocitos jóvenes y recién formados ocupan toda la laguna que presenta unos bordes nítidos y claros, aunque con el microscopio electrónico se observa la existencia de protusiones de mineral calcificado fuera de la línea limitante general del mismo. Salvo en los puntos donde la célula está muy cerca de la pared de la laguna, en cuyo caso la membrana aparece lisa, en los demás puntos no guardan relación las plicaturas de la membrana osteocitaria con el borde de la laguna según Remagen (78) .

2.- En las formas adultas donde hay un aumento de los lisosomas y existe una actividad reabsortiva, la laguna aparece aumentada de tamaño y la célula no la ocupa plenamente. El reborde de la laguna se tiñe con azul de toluidina y aparece de contorno irregular. La reabsorción comienza en la región de la pared de la laguna que está junto al polo citoplasmático del osteocito para extenderse después alrededor.

La membrana se pliega y presenta incluso microvellosidades, parece haber una formación de vacuolas por microfagocitosis. Aparecen lisosomas y mitocondrias hinchadas con gránulos densos en su interior. Según Baud ( 56 ) el primer paso es la reabsorción mineral que transcurre sin cambios morfológicos citoplasmáticos y sólo cuando se produce la reabsorción de la matriz orgánica, que exige la presencia de enzimas proteolíticos, aparecen los lisosomas.

La reabsorción osteocitaria aparece en el 3,9 % de los osteocitos en el hueso adulto normal. Bordier, Jande y Belanger ( 45, 67 ) señalan que ni aun por el estímulo máximo de paratohormona se activan todos los osteocitos, lo que indicaría la existencia de poblaciones osteocitarias diferentes. En las zonas donde se produce la reabsorción, el hueso se transforma en un material amorfo, de poca densidad, con espículas minerales de mayor densidad sueltas en la zona pericelular de la laguna. Los cristales de hidroxipatita desaparecen en primer lugar y a continuación lo hacen las fibras colágenas. La célula y sus prolongaciones se mantienen intactas; pero si el proceso de reabsorción se extiende excesivamente puede llegar a la muerte celular. Rasmussen, etc. (60) señalan por otro lado, que se pueden fusionar varias lagunas osteocitarias entre sí, originando cavidades reabsortivas mayores. Además, puede tener lugar la fusión de varios osteocitos, originando la aparición de osteoclastos multinucleados, lo que es muy marcado en el Paget y en el remodelado del hueso embrionario.

Igual que hay una reabsorción, hay una formación ósea a partir de los osteocitos, como parece indicar el qué en torno a algunos osteocitos adultos se forme una zona de matriz calcificada que se diferencia del resto por su fase mineral que es de menor densidad, y las fibras colágenas, además de ser más finas se encuentran orientadas de manera diferente. Los estudios con glicina marcada con tritio y los estudios de tetraciclina de Vittali, corroboran esta neoformación ósea osteocitaria. ( 83, 84 )

En los osteocitos formadores hay un nuevo aumento del retículo endoplasmático rugoso con aumento de los ribosomas, un aparato de Golgi vacuo-

lar bien desarrollado y las mitocondrias pierden el carácter edematoso que mostraban en las zonas de reabsorción.

Las prolongaciones osteocitarias que penetran en los canalículos cuyo diámetro normal es de 1580 Å aproximadamente, están formados por un haz de filamentos rodeados de una membrana citoplasmática. Por fuera están separados de la matriz mineralizada por una capa de mucopolisacáridos. El material flocular y la lámina osmiófila están siempre presentes, aun en la fase formativa (58,78,79). Los canalículos se ensanchan claramente durante la fase de reabsorción.

Vamos a analizar a continuación la estructura del sincitio celular en virtud del cuál, los osteocitos de la sustancia mineralizada comunican entre sí mediante sus prolongaciones con las células que cubren la superficie ósea endostal, periostal y de los canales de Havers, que en la actualidad se consideran también parte de la superficie endostal. Hemos de señalar que las células de estas superficies en el hueso adulto son aplanadas. Para unos autores son osteocitos y para otros, como Pritchard, osteoblastos en reposo. Para diferenciar estas células de los osteoblastos activos creemos que es mejor llamarlas células limitantes como Baud, u osteocitos de superficie como Bordier.

Las zonas de contacto intercelular bien estudiadas por Loewenstein, 1967-1972, se producen tanto "in vivo" como en cultivos de tejidos. A través de esas zonas hay una mayor comunicación de electrolitos y sustancias con un PM hasta 10.000 como ha medido este autor con microelectrodos, y, según él, está en relación con la concentración local de Calcio que a su nivel es de  $10^{-7}$  M., mientras que en el espacio extracelular es de  $10^{-3}$  M. Así mismo, ha demostrado Loewenstein que el aumento de la concentración citoplasmática de  $Ca^{++}$  rompe los puntos de unión, como sucede inmediatamente tras la lesión celular, y determina que las células intactas se aislen del medio al desconectarse de las células dañadas. (70,71)

Estos puntos de unión demostrados claramente entre osteocitos y os



teoblastos en el hueso joven, se hacen más escasos en el hueso adulto en el cuál toman, en ocasiones, aspecto de canal ( Mathews ). Según Loewenstein, tienen mucha importancia en el paso de información de unas células a otras y, por tanto, juegan un gran papel en los mecanismos de regulación celular.

El sincitio celular se interpone entre los capilares y la sustancia mineral, formando un área de intercambio de aproximadamente  $250 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$  de hueso, con lo que el esqueleto global del adulto representa unos  $1.300 \text{ m}^2$  de superficie de intercambio mineral, en comparación con los  $12 \text{ m}^2$  que integran las superficies de los canales de Havers y del hueso trabecular esponjoso. (61)

Los estudios de Neuman ( 73 ) establecieron que el compartimento - líquido extracelular óseo l.e.o. es rico en  $\text{K}^+$ , pobre en  $\text{Na}^+$  y en  $\text{Ca}^+$  y - su regulación está claramente sometida al control celular. Este espacio - parece estar separado por la barrera celular del espacio extracelular general l.e.g. del hueso. Owen 1973 (76) no encuentra, usando albúmina -  $\text{I}^{131}$ , una clara separación de ambos compartimentos, pero no niega su existencia que parece en la actualidad aceptada por la mayoría de los autores que se ocupan del tema.

Los trabajos de Berridge y Osmann, Mathews, etc. (22,50,79) han - establecido el concepto de membrana limitante funcional, y para aceptar su existencia las células que la integran deben de reunir una serie de condiciones que son:

- 1) Polarización celular
- 2) Zonas de contacto celular especializado (como los que acabamos de describir)
- 3) Microvellosidades
- 4) Interdigitaciones celulares
- 5) Existencia de una lámina basal o una estructura similar, integrada por mucopolisacáridos
- 6) Actividad pinocitótica celular

## 7) Presencia de microtúbulos y microfilamentos

Todos estos datos se han podido recoger en el hueso a nivel de los osteoblastos-osteocitos, como hemos descrito anteriormente, con lo cual parece poder aceptarse la existencia de esta membrana limitante a nivel óseo.

En lo que no están todos los autores de acuerdo es en su fisiologismo. Talmage, Mathews, Remagen, Neuman (39, 73, 82) consideran en conjunto, siguiendo el esquema original del primero, que el l.e.g. pasaría a través de los diferentes poros hacia el l.e.o. libremente y la concentración de solutos a su nivel, se mantendría por una acción metabólica celular de transporte contra corriente de iones desde el l.e.o. al l.e.g., absorbiendo el  $\text{Ca}^{++}$  a nivel de la superficie celular en contacto con el osteoide y, a través de mitocondrias y microtúbulos, sería vertido el  $\text{Ca}^{++}$  al l.e.g. de donde pasaría a la sangre. En apoyo de esta teoría, estaría la presencia de gránulos de  $\text{Ca}^{++}$  en las mitocondrias y microtúbulos, así como de vellosidades en la superficie celular cuya morfología varía según los diferentes estímulos hormonales a los que se someten estas células.

Frente a estos datos Neuman (73) ha encontrado, usando diferentes antimetabolitos celulares, que el paso de  $\text{Ca}^{++}$  en uno y otro sentido, sólo se modifica con trastornos en el metabolismo de los carbohidratos, y postula la liberación de metabolitos del tipo del ácido cítrico para explicar la movilización o retención del  $\text{Ca}^{++}$  óseo.

Por último, Frost, Rasmussen y Bordier consideran otro mecanismo de acción. Según ellos, el flujo del líquido extracelular se produce por movimientos celulares pulsátiles - consecuencia de cambios en la forma celular bajo estímulos mecánicos o eléctricos -, lo que concuerda con los hallazgos de Mathews antes descritos. (45,64-66)

## Osteoclastos

Aunque su existencia y posible función ya se conocían previamente, - fue Kölliker en 1873 quién los bautizó como Ostoklast describiendo, además, su borde en cepillo. En la actualidad se usa la terminología francesa de - osteoclasto.

Son en general células grandes multinucleadas que se encuentran directamente en contacto con el hueso. Hoy está fuera de toda duda que son - las encargadas de la reabsorción ósea. Son células móviles lo que determina su forma variable; unas veces son oval-esféricas como aparecen en las - indentaciones que dejan en el tejido óseo conocidas como lagunas de Howship; otras veces están aplanadas sobre el hueso, en cuyo caso, incluso los nucleos pueden tomar forma aplanada. Se observan en ocasiones, según Hancox, varias masas citoplasmáticas unidas entre sí por puentes protoplasmáticos, en especial, cuando los osteoclastos se alejan de las lagunas de Howship. (97)

Hay que considerar la laguna de Howship como una cavidad labrada en la sustancia mineral ósea por la actividad del osteoclasto, que se encuentra en su interior presentando una forma más o menos redondeada, otras veces pueden colocarse directamente sobre las trabéculas. Siempre están cerca de los vasos (Lucht). Los estudios de Hancox, Johnson ( 96,99), etc. , con microcinefotografía han demostrado que los osteoclastos emigran girando sobre sí mismos, lo que esplicaría su salida de las lagunas de Howship y su diferente morfología. Según Lucht y Dudley, se descubren formas multinucleadas, alejadas de hueso, que no tienen borde en cepillo y que serían osteoclastos inactivos. (18,24,32,37,38,43,89,95,97,99,101,108)

En relación a su tamaño, volumen y número de núcleos hay grandes variaciones. Desde los que miden de 85 a 100 micras de diámetro con un volumen de, aproximadamente,  $20.000 \mu^3$  que aparecen en los procesos patológicos como el Paget y las convierte en las células más grandes de la economía, hasta las formas mononucleares descritas por Tonna, Walker, Duorak, etc. - ( 87, 98, 108 ) .

En general en el hombre adulto normal presentan de 2 a 6 núcleos por célula, con un tamaño de 20 micras aproximadamente. Los núcleos son en general ovales, aunque pueden presentar modificaciones de su forma de acuerdo con las variaciones del citoplasma. Con frecuencia presentan 1 ó 2 nucleolos y se observan formas picnóticas en las células que muestran un aspecto degenerado ( 97 ) .

El citoplasma con el microscopio ordinario presenta en unas ocasiones caracteres tintoriales basófilos y en otras acidófilos, pero sin un predominio tintorial especial que varía con la actividad funcional de los mismos.

Walker en 1972 demostró la existencia de gran cantidad de fosfatasa ácida deshidrogenasa láctica, málica y citrato en el citoplasma de los osteoclastos, haciendo determinaciones cuantitativas de las mismas. Gay y Mueller ( 93 ) han demostrado la presencia de carbónico anhidrasa en elevada concentración.

Con el microscopio electrónico se puede observar que los osteoclastos son las células óseas que presentan el mayor número de mitocondrias, tanto en valor absoluto como relativo. Aparecen distribuidas en todo el citoplasma salvo en la zona inmediata al borde en cepillo. Las crestas de estas mitocondrias son muy grandes y pueden ocupar todo el centro del orgánulo. Se ven con gran frecuencia gránulos electrónicamente densos compuestos por fosfato cálcico amorfo en su interior.

El retículo endoplásmico más o menos desarrollado según las células, nunca alcanza las dimensiones y complejidad que presenta en los osteoblastos. Las membranas se colocan apretadamente, pero son escasas sus dilataciones y los ribosomas pueden presentarse sueltos en el citoplasma. Aparecen también vesículas aisladas del retículo endoplásmico, pero no son demasiado identificables por la gran cantidad de estructuras que contiene el citoplasma de estas células.

El aparato de Golgi muy bien desarrollado aparece reunido en grupos de membranas de 5 sacos cada uno, que se agrupan en torno a los núcleos o a centriolos como han demostrado los trabajos de Lucht (100). En la zona más próxima al núcleo se separan entre sí las membranas. En el polo opuesto de la célula aparecen en relación con vesículas que se extienden más o menos lejos en el citoplasma y en las que Cameron (89) describe la presencia de estructuras densas similares a las de los cristales de apatita.

Hay asimismo en el citoplasma una serie de gránulos densos rodeados de una membrana separada por un espacio claro de la zona densa. Scott indica que son más abundantes cuando el borde en cepillo está más desarrollado y Doty ha demostrado en muchos de estos gránulos la presencia de fosfatasa ácida. Aunque en ocasiones se disponen en hileras, no muestran una distribución particular. Algunas de estas estructuras redondeadas a modo de vesículas, pueden considerarse como lisosomas. Junto a ellas aparecen también vacuolas, que unas veces se encuentran vacías en tanto que otras aparecen parcialmente rellenas de un material denso. Se demuestran también autolisosomas.

Una parte de los gránulos y vacuolas tiene una membrana de  $10 \text{ Å}$  lo que es característico para los lisosomas y, tanto en los gránulos como en las vacuolas, Doty y Lucht han demostrado la presencia de fosfatasa ácida. Como ya hemos señalado, una parte de las vacuolas citoplasmáticas derivan de la membrana del borde en cepillo, en tanto que, los gránulos parecen producirse en el aparato de Golgi. Ambas estructuras serían índice de procesos de absorción y exocitosis respectivamente.

Lo que más debates ha causado hasta la aparición del microscopio electrónico, ha sido la estructura del borde en cepillo y su función. Este borde en cepillo fue ya descrito por Kölliker en 1873 quién lo consideró como perteneciente a la célula. Pommer en 1883 decía que, en parte, pertenecía al hueso y a la célula. Ham en 1956 decía, por el contrario, que era debido a la exposición de fibras colágenas de la matriz ósea tras la reabsorción de material cálcico. Hancox en 1956 afirmaba que era produci

do por la exposición de las fibras colágenas, entre las cuales se introdu\_ cían prolongaciones citoplasmáticas del osteoclasto. (95,105,276)

El borde en cepillo siempre está orientado perpendicularmente a la superficie ósea, así como a la célula. Con la microscopia ordinaria y en especial con la microscopia de contraste de fases, se ve entre el borde en cepillo y el resto de la célula una zona clara desprovista de estructuras. La zona clara de Cameron presenta alguna vez ribosomas y, según Lucht, -- está repleta de pequeños filamentos de 50-100 Å de longitud orientados -- al azar.

El microscopio electrónico ha aclarado perfectamente que el borde -- del cepillo es una parte diferenciada de la membrana celular especializada en la reabsorción ósea. Está formado por repliegues de la membrana y pro\_ longaciones digitales de la misma, que tienen de 100 a 150 micras de diáme\_ tro y su extremo puede aparecer ensanchado. Unas veces son alargadas y -- los canales entre ellas estrechos, y otras las prolongaciones son cortas y los espacios extracelulares imbricados más anchos. El tamaño según Luk -- ( 37) varía con el estado funcional de la célula. El fondo de los recesos termina ensanchándose en su fondo en vesículas o en grandes vacuolas, que en parte son imágenes debidas a cortes tangenciales del borde y no repre\_ sentan más que las prolongaciones de esos fondos de saco. Por otro lado , hay dentro del citoplasma vacuolas reales.

A lo largo del borde en cepillo y entre sus pliegues, se describió -- desde un principio la existencia de cristales y de fibras colágenas que -- no se encuentran nunca en las vacuolas celulares, en las cuales sí apare\_ cen gránulos de apatita y un material amorfo de carácter desconocido.

Luk describe la existencia de prolongaciones citoplasmáticas latera\_ les que contactan con los osteoblastos vecinos.

A nivel del hueso, donde se produce el proceso de reabsorción, hay una pérdida de la lámina limitans descrita por Scherf que, según este autor

## II - M A T R I Z   O S E A

Sustancia fundamental

Mucopolisacáridos ácidos

Las glicoproteínas

Colágeno

Calcificación

Mineral

y Luk, representa una zona de adsorción de material orgánico sobre y entre los cristales de apatita y aparece en las regiones en reposo funcional donde no se deposita ni se reabsorbe hueso. (37,38)

Bajo el borde en cepillo además de desaparecer la membrana limitans, surge una gran cantidad de fibras colágenas fragmentadas y dispersas entre las que se introducen las microvellosidades. Entre las fibras colágenas hay cristales de apatita con un diámetro medio de  $75 \text{ \AA}$  y varios cientos de longitud. En el límite de la zona de reabsorción aparecen fibras colágenas más densamente agrupadas. (88,90,91,93,94,102,103,106,109)

## 2 - M A T R I Z   O S E A

Vamos a considerar someramente, ya que, no es el tema propio de -- nuestra investigación, la función de estas células en relación a la matriz ósea, es decir, al mineral, colágeno y sustancia fundamental, su estructura y formación, para después considerar las diferentes maneras de organizarse en hueso. Comenzaremos por la sustancia fundamental, lo que corresponde al cemento de los tejidos colágenos no mineralizados.

### Sustancia fundamental

Al buscar una definición de matriz encontramos que Eastoe ( 115 ) da dos posibilidades: 1) sustancia o medio que incluye otros cuerpos -- 2) un medio en el que se desarrolla algo (definición retomada por Herring en 1972). Sylven considera como sustancia fundamental del tejido conjuntivo al material amorfo interfibrilar, situado en el compartimento extracelular con relaciones funcionales y de origen con los fibrocitos. (118,124)



Estas sustancias fundamentales son relativamente poco conocidas . - Su estudio, comenzado por Hawk y Gies a principio de siglo, sólo ha alcanzado un gran desarrollo recientemente.

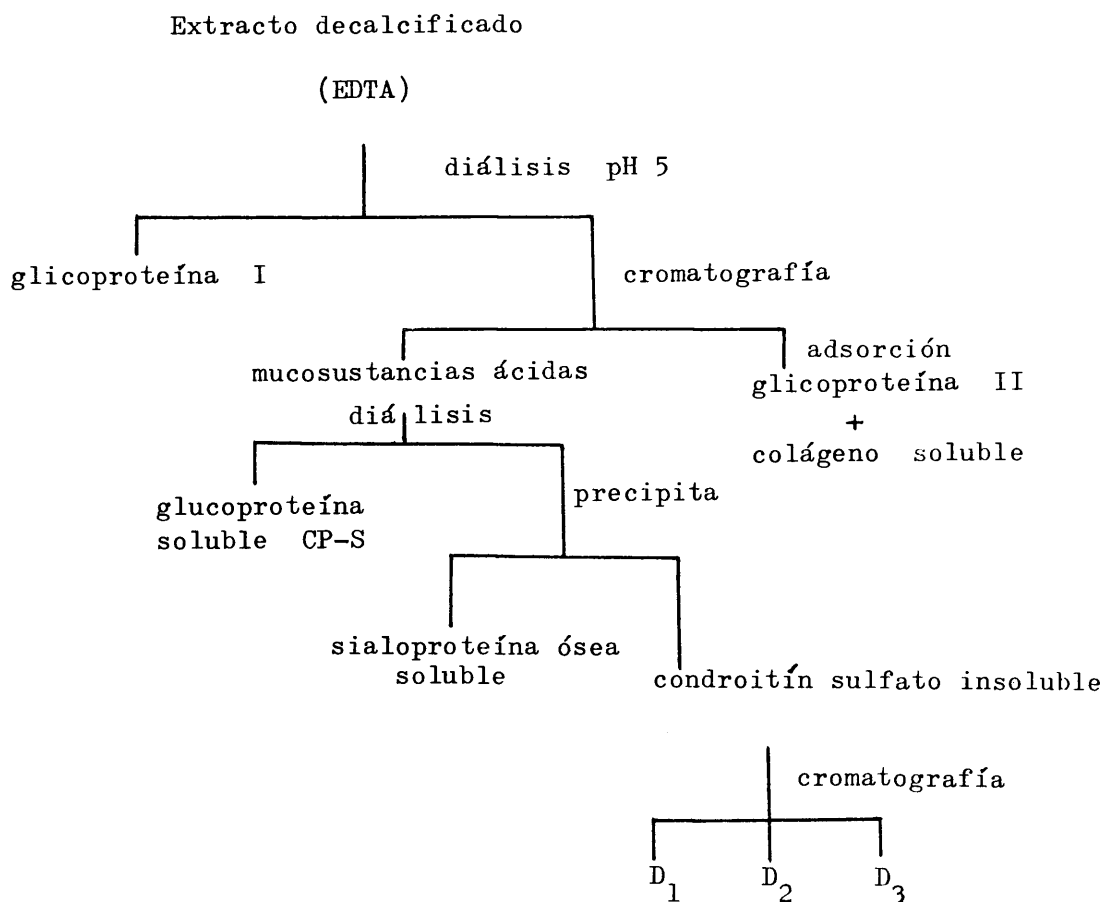
Al analizar la composición de la parte no celular del hueso, Zerloti y Yaeger consideran que la matriz de todos los esqueletos de los vertebrados se componen de una porción proteica principal, en general fibrosa y una serie de carbohidratos y lípidos. Eastoe señala en la sustancia intercelular, la presencia de cristales inorgánicos que corresponden a la hidroxiapatita, fibrillas que corresponden a la colágena y por fin una sustancia fundamental que corresponde a los mucopolisacáridos, lo que en 1956 ponía aún con interrogación (118,119,127)

Hoy parece fuera de duda que esa sustancia fundamental cementante - está formada por mucopolisacáridos, es decir, por polisacáridos asociados a una proteína por uniones covalentes. Hay dos tipos generales, por un lado, unas proteínas polisacáridas conocidas como glicosaminoglicanos o proteoglicanos y, por otro, las glucoproteínas. En el hueso, la matriz orgánica representa, según Herring (119) , entre el 22,7 y el 23,9% de su peso global seco, de ello el colágeno representa el 72% para la zona trabecular esponjosa y el 96% para el hueso cortical. Los mucopolisacáridos ácidos son en el hueso esponjoso el 3,3% de dicho peso para Campo y el 4,1% para Herring - en tanto que las sialoproteínas incluyen 0,4% para Campo y el 2,3% para Herring. (111,119)

Su conocimiento ha ofrecido grandes dificultades por los problemas - que tiene su extracción a partir del hueso, ya que, la primera forma de obtenerse es desmineralizando el hueso con métodos ácidos. A continuación se separa el colágeno por ebullición para poder analizar los productos restantes, que se diferencian a su vez por distintos métodos como la precipitación con etanol, la cromatografía, etc.. Más tarde se pudo observar que al desmineralizar con ácidos, se perdía una parte importante de la sustancia fundamental que se podía recuperar si se desmineralizaba con quelantes tipo EDTA. Los compuestos así individualizados son las sialoproteínas.

Una extensa revisión de los problemas de aislamiento y descripción de los mucopolisacáridos se encuentran en Herring , Zerlotti y Yaeger ( 114,119,127) quienes se ocupan, en especial, en la histoquímica de estas sustancias, ya que, desde Gies se sabe que una parte de estos cuerpos se tiñe con el Pas, las glucoproteínas, mientras que los mucopolisacáridos ácidos presentan como carácter histoquímico fundamental la metacromasia. El esquema de Herring nos parece muy demostrativo para catalogar -- los diferentes elementos encontrados y las vías requeridas para su extracción a partir del hueso cortical.

# ESQUEMA I



Además de los métodos bioquímicos se puede, como hemos señalado, estudiar estos cuerpos con métodos histoquímicos, por un lado el P.A.S. de Hotchkiss y Mc Mannus y por otro la metacromasia originalmente descrita por Lisson. En menos cuantía se ha usado también el azul de alcian y el método de Halle del hierro coloidal. Nos vamos a referir exclusivamente a los dos primeros.

El PAS parece ser específico para una serie de cuerpos compuestos de glucógeno y proteínas, las denominadas glucoproteínas que poseen grupos reactivos libres en posición 1, 2, glucosil. Según Leblond (35) las glucoproteínas que reaccionan con el PAS tienen siempre galactosa, fucosa, hexosamina y, con frecuencia, ácido siálico, que como señalamos presentan grupos libres en el azúcar en posición 1 y 2. Los estudios del hueso sin descalcificar, muestran que el tejido recién mineralizado se tiñe intensamente con el PAS. Esta reacción, según los estudios de Okamoto (119), disminuye al aumentar el grado de calcificación.

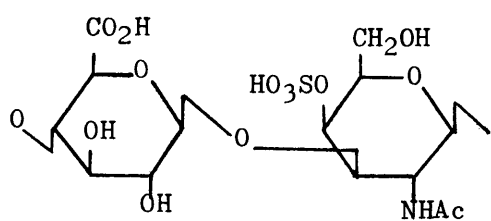
La metacromasia es el cambio de color que sufren algunas sustancias al unirse a ciertos substratos. Los mejores resultados se obtienen en los tejidos mineralizados con el azul de metileno, el azul de toluidina y el azul de alcian. Lisson demostró que sólo aparece en presencia de ésteres sulfúricos de alto peso molecular y que los mucopolisacáridos sulfatados ácidos, aparte de otras sustancias, muestran todos como base común la gran densidad de cargas negativas en su molécula y su elevado peso molecular.

Todos los autores están de acuerdo en que el osteoide es metacromático y si la tinción se hace con soluciones concentradas, el área de transición entre la banda osteoide y la matriz calcificada, es más intensamente metacromática que el resto del osteoide y las zonas mineralizadas que, según Yaeger, no son metacromáticas sea cual sea el procedimiento desmineralizante empleado. Okamoto, estudiando la reparación ósea, ha demostrado que el osteoide y el hueso recién mineralizado se tiñen con gran intensidad y que a medida que aumenta la mineralización disminuye la metacromasia, hasta hacerse los tejidos ortocromáticos. (45,127)

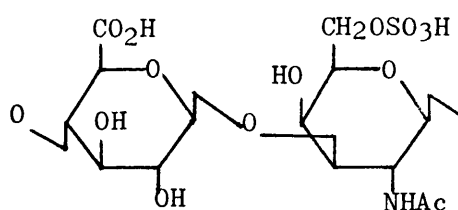
## Mucopolisacáridos ácidos

El análisis químico de los mucopolisacáridos ácidos o proteoglícans fue iniciado por Mayer en 1956 (120), quién demostró que el núcleo polisacárido estaba formado por cadenas lineales de azúcares, las llamadas hexosaminas, y por ácidos urónicos, con o sin esteres sulfúricos, que se unen a una proteína. En el hueso, la unidad básica que se repite para formar el polímero puede ser de cuatro tipos: a) el condroitín 4-sulfato; b) el condroitín 6-sulfato; c) el ácido hialurónico; d) el queratán sulfato -- (cuya fórmula representamos en el esquema 2). Las uniones entre los monosacáridos; glucosa, galactosa y sus aminos y el ácido glucorónico, se hace en posición 1-3 para el ácido glucorónico y 1-4 para las glucosaminas.

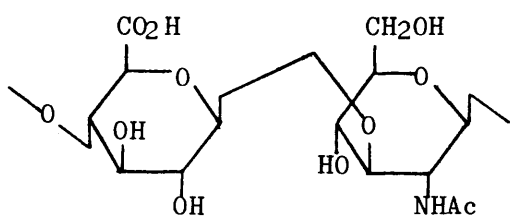
### E S Q U E M A 2



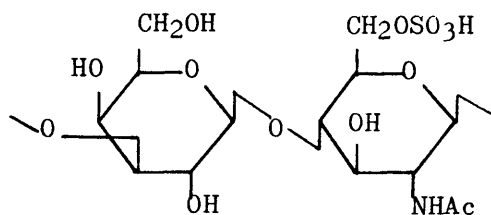
Condroitín 4-sulfato



Condroitín 6-sulfato

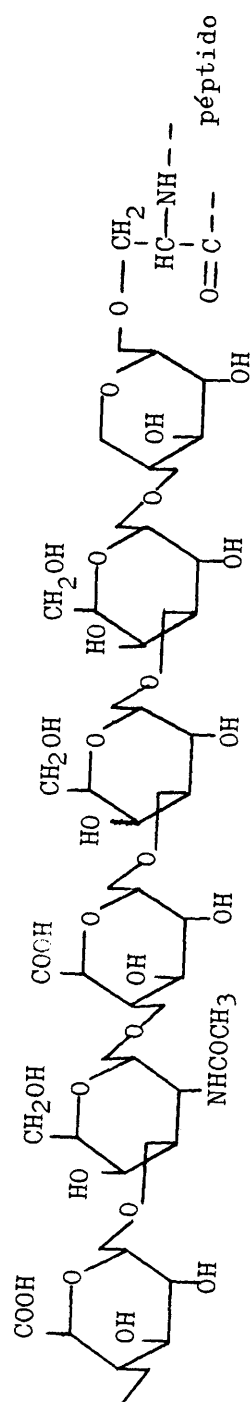


Acido hialurónico



Keratán sulfato

ESQUEMA 3



Herring ha analizado por ultracentrifugación y electroforesis los componentes aislados por él, señalados como  $D_1$  ,  $D_2$  ,  $D_3$  en el esquema I obteniendo los datos que figuran en la tabla I.

T A B L A I	Expresado en tantos por ciento		
	$D_1$	$D_2$	$D_3$
ácido glucorónico .....	17,1	22,1	30,1
galactosamina .....	13,9	17,9	25,1
glucosamina .....	1,7	1,2	< 0,1
hexosa .....	5,2	4,2	0,9
ácido siálico .....	12,1	6,9	< 0,05

El análisis cuidadoso de los diferentes azúcares para D-1 y D-2, así como para las sialoproteínas, señalan que el D-1 y la sialoproteína coinciden en tener galactosa, manosa y fucosa y que D-1 presenta así mismo xilosa que no aparece en las otras fracciones.

Rodens (122) ha demostrado que la xilosa es el punto de unión de la cadena de condroitín-sulfato a la cadena proteica en estos proteoglúcosos. Se unen dos galactosas a la xilosa y ésta a la serina, que es el aminoácido de la cadena proteica al que se une el polisacárido como vemos en el esquema 3.

El núcleo polisacárido, que es un polianión con muchos puntos ácidos, está unido por fuertes enlaces covalentes a las proteínas, cuyos restos de aminoácidos aparecen en la tabla 2 y son muy similares para D-1 y D-2, menos para D-3.

T A B L A 2	Aminoácidos más frecuentes en número de residuos		
	D 1	D 2	D 3
ácido aspártico .....	162	162	138
treonina .....	75	87	81
serina .....	111	97	111
ácido glutámico .....	200	194	131
prolina .....	61	63	83
glicina .....	127	140	127

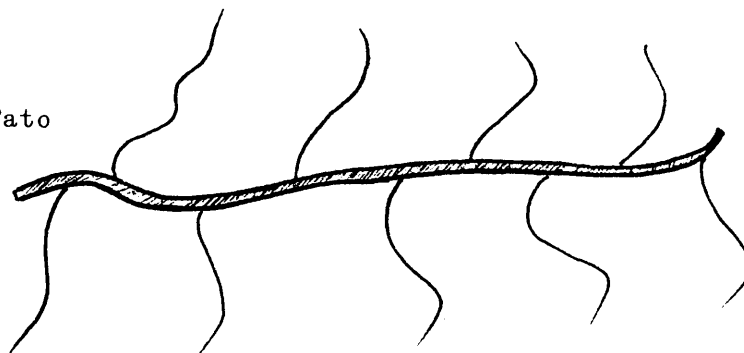
Aunque los datos no son conclusivos, parece que el PM de la proteína es aproximadamente 25.000 y el de las cadenas de condroitín sulfato sería - para cada una de ellas entre 22.000 y 25.000.

La representación esquemática de un mucopolisacárido ácido de este tipo sería:

ESQUEMA 4

cadenas de  
condroitín sulfato

cadena  
proteica



Todos estos datos parecen señalar que los mucopolisacáridos óseos - son bastantes diferentes a los del resto de la economía (110,112,116).

### Las glicoproteínas

Lo que Hawk y Gies en 1901 denominaron óseomucoide difiere del grupo anterior, a pesar de tratarse de polisacáridos unidos a proteínas, en - que no se repite tan regularmente en su molécula la estructura disacárida - del esquema núm. 2 y que los azúcares tienen cadenas más cortas, entrando a formar parte de los mismos un gran número de monosacáridos diferentes como son la glucosamina, la galactosamina, la galactosa, la manosa, la fucosa y el ácido siálico, que se unen en cadenas cortas de hasta tres radicales.

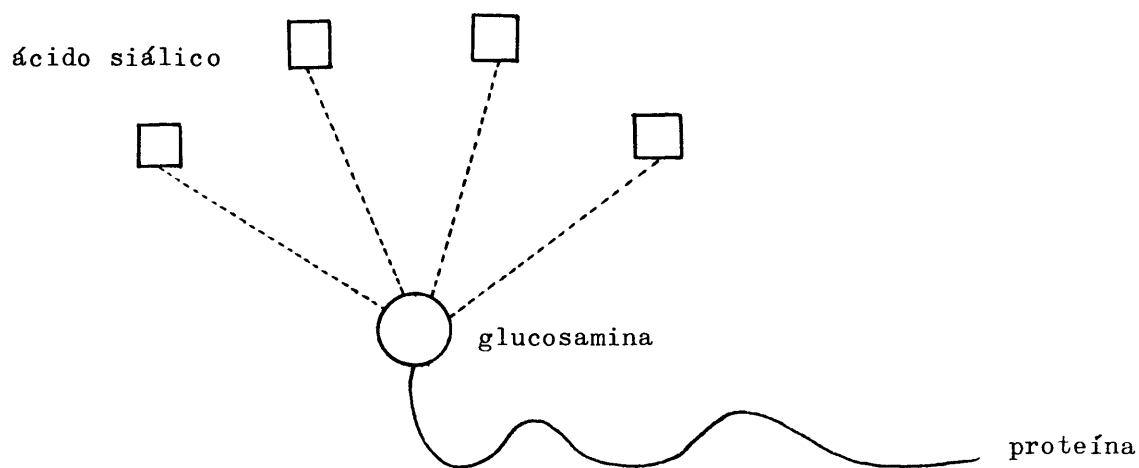
Parece que la cantidad de glucoproteínas disminuye a medida que el - hueso se calcifica, como hemos señalado anteriormente, con un máximo en el osteoide y un mínimo en el hueso cortical adulto. Los trabajos de Dische - (113) en 1958 indicaban que el colágeno se unía intensamente a una serie de polisacáridos, por un lado formas con manosa hexosamina y fucosa y, por otro, formas con galactosa y glucosa. En trabajos posteriores se ha demostrado que la galactosa y glucosa forman parte normal de la molécula de colágeno.

La glicoproteína ósea tiene un PM de 23.000, ha sido bastante estudiada por Herring, quién en la actualidad le da un valor entre el 0,8 y el 1,5% del peso seco global del hueso cortical en comparación al 0,24% que - representan los proteoglicanos.

En su composición entre una gran cantidad de ácido siálico, glucosamina, galactosamina y un elevado número de residuos de ácido glutámico y aspártico, lo que no es frecuente para una glicoproteína. Las proporciones de los diferentes componentes de la molécula son: ácido siálico 20%; galactosa 8,2%; manosa 2,5%; galactosamina 4,6%; proteína 47,9%.



Según Andrews y Herring el componente polisacárido se combina en un grupo único de peso molecular aproximado a 9.220 formando una estructura - ramificada, que se une por un solo punto a la proteína de forma que el áci\_ do siálico y la fucosa ocupan los extremos. Hay después una secuencia de - 1 manosa y 9 ó 10 galactosas y, tras una serie de pasos intermedios, apare\_ ce un núcleo central que contiene una galactosa, una manosa y tres glucosa\_ minas, siendo la glucosamina la responsable de la unión con la proteína -- ( según el esquema 5 modificado de Herring ).



Los estudios de la cadena proteica señalan que una gran parte de los radicales tienen su grupo ácido libre, lo que explica la reacción ácida de - la molécula aún después de eliminar el ácido siálico. Tiene además la pro\_ teína grupos fosfóricos libres que corresponden a ésteres de la serina.

Esta macromolécula capta intensamente los iones metálicos, y los estu\_ dios de Williams indican que es un inhibidor de la precipitación del fosfato cálcico mucho más fuerte que el condroitín sulfato. Las glucoproteínas - - óseas y dentales son específicas, como han demostrado los estudios comparati\_ vos de la sialoproteína que nos ocupa, con la de los tendones y con el óseo- mucoide circulante.

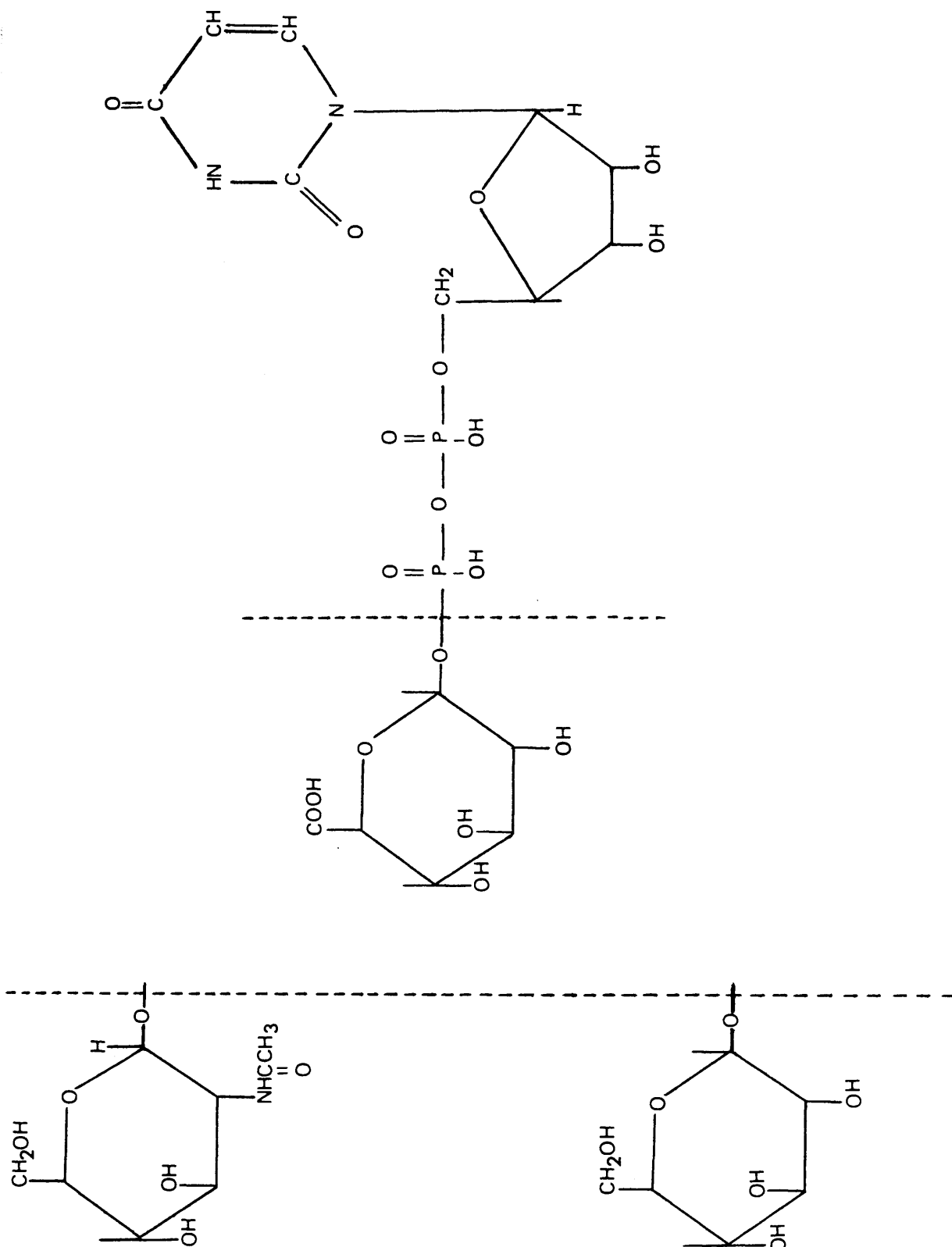
Por último, hay que señalar que algunos autores no descartan la posibilidad de que estas glucoproteínas correspondan a proteínas plasmáticas - acantonadas en la sustancia fundamental del hueso, en general, la mayoría - de estas proteínas plasmáticas se consideran albúmina y no suman más del 1% del peso de la matriz orgánica. Encontramos una puesta al día en Owen (76).

Vamos a pasar a continuación a estudiar la síntesis de los mucopolisacáridos, considerada en la actualidad por todos los autores como un proceso endocelular que consta de varias fases, puesto que, en todas estas sustancias encontramos la matriz proteica y el polisacárido, los cuales en una fase ulterior deben unirse entre sí. (110,117,121,122,125)

La proteína se sintetiza en el R.E. rugoso de acuerdo al A.R.N. mensajero, según la información codificada en el A.D.N. tras activación de los aminoácidos. Esta síntesis de la cadena proteica no es diferente al de la formación del resto de las proteínas. A nivel del hueso, las células encargadas de la producción de los mucopolisacáridos son los osteoblastos cuyo R.E. está muy desarrollado como hemos señalado más arriba.

La porción polisacárida se sintetiza a partir de monosacáridos, que se activan al unirse a un nucleótido que para los proteoglicanos es el uridindifosfato U.D.P. según Silbert (122), en tanto que, para las glucoproteínas intervienen otras bases, como señala Weinstock (125), que son el guanidindifosfato G.D.P. para la manosa y fucosa, y el citidín-monofosfato C.M.P. para el ácido siálico. Las formas más frecuentes aparecen en el esquema 6 y se forman, o bien en presencia de una pirofosforilasa, o bien - unos se transforman en otros, siendo los compuestos claves para los mucopolisacáridos la U.D.P. glucosa, la U.D.P. -N- acetilglucosamina.

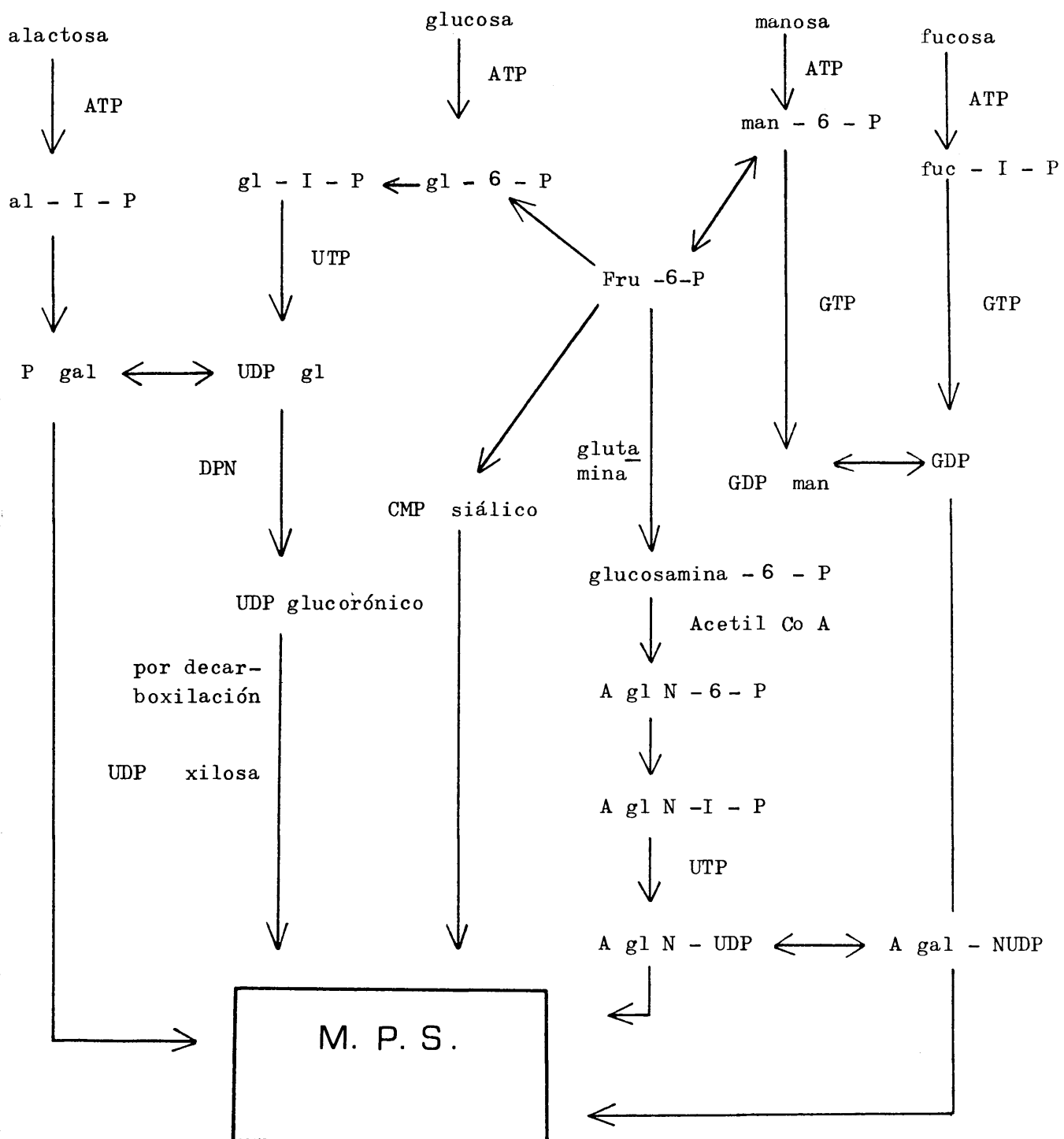
Las relaciones entre unos y otros se pueden ver en el esquema núm. 7 modificado a partir de Silbert y Leblond (35,36,122).



ESQUEMA - 6 -

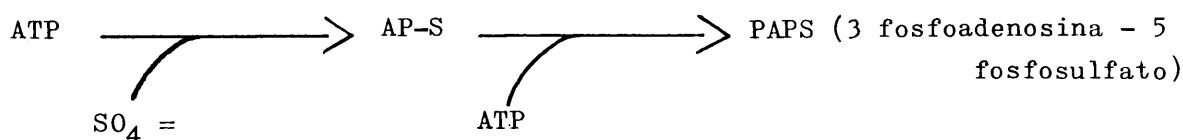
# ESQUEMA - 7 -

( Modificado de Herring y Silbert )



En este ciclo la U.D.P. acetilglucosamina inhibe por retroalimentación su propia síntesis y la U.D.P.-xilosa inhibe el paso de glucosa a ácido glucorónico.

La azufración de los residuos se hace en forma intracelular por activación con A.T.P. a través de los



tras la activación de enzimas intracelulares. La presencia de los iones sulfato, así incorporados a la molécula del proteoglicano, le dan un mayor carácter anionico (Hernández-Richter) y la posibilidad de captar un mayor número de cationes. (117)

El momento de producirse la sulfatación no es claro, parece que es coetáneo a la polimerización del azúcar y en unas formas tiene mayor especificidad que en otras, como sucede para el condroitín-4 y el 6-sulfato. Silbert señala, que la unión del radical sulfato tiene lugar cuando la molécula ha alcanzado un cierto nivel de organización y se hace, siguiendo la ley del todo o nada, por un enzima muy similar al que produce la polimerización; no se conoce el mecanismo exacto de actuación del enzima sulfatante.

Otro punto importante a considerar es la unión del polisacárido a la proteína, que debe estar formada previamente para que tenga lugar el ensamble de la molécula completa. El oligosacárido que se une a la proteína es la xilosa-galactosa-galactosa que lo hace a un residuo hidróxilo de la serina a través de la xilosa ( como señalamos en el esquema 3 ) y tiene lugar paso a paso. El primero de ellos es la transferencia de la xilosa desde la U.D.P.-xilosa al hidróxilo de la serina según Robinson y Greuber y, sobre esta unión se enganchan a continuación las dos moléculas de galactosa a partir de la U.D.P.-galactosa, para lo cual parece existir dos galactosil-trans

ferasas diferentes como indican los estudios de Robinson en el cartílago . Sobre este trisacárido se une una molécula de ácido glucorónico por medio de otra transferasa específica, quedando el punto de unión estructurado como sigue: serina-xilosa-galactosa-galactosa-ácido glucorónico. A partir de las formas activadas se engarzan uno a uno los demás residuos monosacáridos de la molécula. Según los datos de Dorfman y cols., parece que al añadirse azufre a un radical N-acetil-galactosamina se inhibe la unión de más azúcares, determinando así el fin del crecimiento de la cadena polisacárida a este nivel.

Como ya hemos señalado, la síntesis de la matriz proteica tiene lugar en el sistema retículo endoplasmático rugoso donde además se unen los primeros azúcares. Desde ahí pasa la molécula al aparato de Golgi donde se terminaría de polimerizar según Lucy y Fell. (45,119,122)

Los estudios morfológicos de Fitton-Jackson y Randall (23,27,30),- indican la presencia en el interior de los osteoblastos de gránulos PAS -- positivos que interpretaron como polisacáridos. Con el M.E. Weinstock y Le blond ( 36,125 ) en el osteoblasto y odontoblasto con técnicas autoradiográficas, llegan a la conclusión de que las proteínas son sintetizadas en el retículo endoplásmico, del cuál pasan en unas vesículas llamadas intermedias a los sáculos externos del aparato de Golgi, donde también muestran un acúmulo de galactosa, fucosa y radical sulfato. Parece, pues, que en los sáculos externos del aparato de Golgi entra una molécula incompleta, en principio la proteína, que por polimerización y sulfatación origina el mucopolisacárido completo; que desde las vesículas internas del aparato de Golgi, pasa a las vacuolas de condensación que eliminan gránulos de secreción, los cuales por exocitosis vierten los mucopolisacáridos al medio extracelular para formar la sustancia fundamental.

La función de las mucoproteínas óseas, según los autores, parece estar en relación con la calcificación, por lo que hablaremos de la misma al ocuparnos de los problemas de mineralización ósea.

Los otros componentes que entran a formar parte de la matriz orgánica, al margen del colágeno y de las mucoproteínas, aparecen en mu --  
cha menor cantidad y sólo nos vamos a referir someramente a los lípidos --  
cuya proporción, según Leach, es del 0,067 al 0,035% del peso total óseo.  
De ellos el 79,2% son triglicéridos, el 13,3% es colesterol libre, el --  
1,7% son esteres del colesterol y el 2,2% está formado por fosfolípidos --  
que, según los trabajos de Irving y Wuthier ( 182 ) 1964, tienen una ma --  
yor importancia porque en sus estudios con sudan negro muestran su apari --  
ción en el frente de calcificación, desapareciendo en el momento que se --  
produce ésta. Es decir, hay un acúmulo de lípidos en la zona inmediate --  
te anterior al punto en el que se produce la calcificación ósea, desapare --  
ciendo de manera brusca cuando se produce el depósito mineral.

### Colágeno

Como señala Roviller ( 145 ) los tejidos conjuntivos derivan del mesodermo embrionario y se dividen en cuatro tipos: el tejido conj --  
tivo propiamente dicho; el cartílago; el hueso y el tejido hematopoyético,  
por tanto, el hueso es un tejido conjuntivo con la particularidad de tener  
su sustancia fundamental calcificada. En todos los tejidos conjuntivos el  
componente fundamental es la fibra colágena que, además, es la proteína --  
más abundante del reino animal según Rojkind ( 144 ) .

Los análisis de su composición y concentración en el hueso se  
revisan por Herring ( 119 ), etc.. Para el hueso cortical adulto bovino ,  
entre el 76 y el 77% de su peso seco es material inorgánico, siendo el res --  
to el componente orgánico del cuál entre el 88,4% y el 89,1% está represen --  
tado por el colágeno. Campo, Tourtellotte ( 111 ) y Wuthier ( 182 ) com --  
paran la composición de diferentes regiones del esqueleto en el ternero --  
donde la matriz orgánica representa entre el 22,7 y el 23,9% del peso glo --  
bal del polvo óseo seco y de esta matriz orgánica entre el 89,1 y el 88,4%,  
según Eastoe y Herring respectivamente, es colágeno.

Vemos así que el colágeno es un elemento muy importante de la fase extracelular ósea.

A nivel del hueso su obtención, como la de los otros componentes , ofrece dificultades especiales porque hay que separarlo de la matriz inorgánica, lo que se puede hacer de varias formas: eliminando la fase mineral ósea con E.D.T.A. o con descalcificantes ácidos con lo cuál una parte del colágeno soluble se pierde. Asciende a un 2% como se comprueba al usar -- E.D.T.A. a PH 7,9 y a 4 grados - según Herring ( 119) -, aumentando claramente este porcentaje si se hace a mayor PH y a temperatura ambiente. - Otra forma de extraer el colágeno es por ebullición, con lo cuál se desnaturaliza y la gelatina soluble así obtenida precipita regenerando la fibra colágena espontáneamente. La escuela de Glimcher obtiene el colágeno a partir de hueso en polvo que descalcifica y a continuación somete a -70° de temperatura con ácido acético al 3%. Otra manera sería mediante cloruro de litio y tiomalato potásico o clorhidrato de guanidina como métodos - de extracción desnaturalizantes de la molécula colágena. Los extractos - así obtenidos se someten a cromatografía contracorriente en columna de celulosa.

Antes de entrar en la descripción de la molécula de colágeno, hemos de señalar rápidamente los métodos que se han empleado para su análisis y estudio una vez aislada. Más allá de microscopio ordinario y de información reducida, se ha empleado el microscopio de luz polarizada y, en especial, el microscopio electrónico, que ha permitido con los estudios de difracción con rayos X de corta longitud de onda, con la espectografía de rayos infrarrojos y con el análisis de resonancia del spinn electrónico, estudiar la estriación de la fibra colágena y su estructura molecular. Junto a los métodos físicos están los estudios bioquímicos iniciados por Nageotte (132). Gallop (133) ha desarrollado un método para obtener formas muy purificadas por ultracentrifugación del extracto colágeno, que a continuación se dializa en un buffer fosfato 0,02 molar. Sea cual sea el método empleado, el colágeno así obtenido se puede diluir en ácido acético y reconvertir a continuación en diferentes estructuras fibrilares. Una -



vez obtenidas las cadenas aisladas, el estudio de su composición y estructura se puede hacer extrayendo sus diferentes aminoácidos, bien por métodos enzimáticos o bien por métodos químicos. Los enzimáticos emplean lo que se denomina colagenasas y, siguiendo a Seifert (138), se consideran únicamente como tales las enzimas capaces de producir una escisión hidrolítica de los enlaces peptídicos que se encuentran en la región helicoidal tipo poliprolina del colágeno. Estas colagenasas pueden ser tisulares o ser obtenidas a partir de microorganismos como el *Clostridium histolyticum*. Por el contrario las proteasas, por definición, son enzimas que sólo producen una escisión hidrolítica de las uniones peptídicas de la zona carbono o nitrógeno terminal del colágeno.

De los análisis químicos de la molécula y sus residuos, el más usado es el método de separación por el bromuro cianhídrico CNBr, ya que, su empleo da muy pocas reacciones colaterales cuando se emplea a un pH bajo. Lasa las proteínas a nivel del carboxilo de los residuos de metionina y da lugar a una homoserina o su lactona por cada uno de los péptidos individualizados. Esto permite separar el colágeno, por la escasez de residuos de metionina que hay en su molécula, en varios péptidos que así pueden analizarse mejor tras su purificación. Esta técnica iniciada por Nordwig y Dick y desarrollada intensamente por Bornstein y col., ha dado grandes frutos junto a los estudios antigénicos de los diferentes péptidos obtenidos. (132,133,135,140)

La combinación del método del CNBr con la digestión enzimática y la tipificación inmunológica, ha permitido un mayor conocimiento de la estructura y la secuencia de los aminoácidos de las cadenas proteicas que constituyen la fibra colágena.

Piez y Eastoe demuestran para el colágeno óseo una serie de cualidades físicas que lo diferencian del colágeno de los tejidos blandos y son: 1) su menor solubilidad en soluciones salinas; 2) una menor temperatura de plegamiento, tras el cual no vuelve a extenderse la molécula de colágena al enfriarse; 3) la fibra no se edematiza a pH bajo; --

4) tiene una mayor solubilidad de la fracción insoluble con los disolventes que rompen los enlaces covalentes según Mills y Bavetta. (137)

Parece demostrado que la composición del colágeno en aminoácidos varía de unas especies a otras; pero dentro de una misma especie la composición en los diferentes tejidos es bastante constante, como vemos en la tabla número 3.

T A B L A     3	Número de residuos aminoacídicos por 1000 aminoácidos .			
	H O M B R E		P O L L O	
	piel	hueso	piel	hueso
hidroxiprolina .....	93	100	104	102
serina .....	36	36	30	29
prolina .....	128	123	118	116
alanina .....	110	113	122	121
valina .....	24	24	16	17
metionina .....	6	5	7	7
tirosina .....	2	4	2	2

La fibra colágena aparece con el microscopio ordinario compuesta - por fibrillas llamadas por Rouiller (145) fibras primitivas, tienen de 2 a 10 micras de diámetro y están formadas por las microfibrillas que mi - den entre 2000 y 250 Å de longitud según Roviller, y con un diámetro en tre 0,2 y 100 micras según Rojkind. (144,145)

La microfibrilla o fibrilla colágena propiamente dicha, muestra - una periodicidad a lo largo de su eje longitudinal como describiera Bear - en 1942 en estudios de difracción con rayos X y que confirmaron después - Schmitt en 1942 y Wolpers en 1943 con el microscopio electrónico. En la - fibra colágena desecada, la periodicidad puede oscilar entre 400 y 1000 Å según Schmitt con un promedio de 640 Å. La estriación está formada por dos zonas: la A y B de Schimtt. La banda A es más ancha y oscura y a su vez, según Rouiller, puede dividirse en dos sub-bandas separadas en tre sí por un surco. La banda B es más estrecha, más clara y más per - meable al paso de los electrones. Los mismos estudios indican la presen cia de cinco bandas finas denominadas  $\delta$ . Cuatro de las cuales están en la banda A y la otra en la banda B.

Para Rouiller, Bear, etc., la fibrilla se forma por la reunión de otras unidades inferiores denominadas protofibrillas, que equivaldrían - a las cadenas polipeptideas. El análisis de las mismas con rayos X de -- gran ángulo de difracción, muestra que se forman por 3 unidades caracterís ticas que se repiten. Una de esas unidades mide 2,86 Å y está orienta da a lo largo del eje de la protofibrilla y los otros elementos se sitúan perpendicularmente al eje a 11 y 4 Å respectivamente.

Los primeros análisis químicos mostraron un hecho único para el co lágeno y es que un tercio de sus aminoácidos es glicina y un cuarto proli na o hidroxipolina.

Las microfibrillas o protofibrillas se forman por la asociación de unidades de tropocolágenos, con un peso molecular aproximado de 300.000 y una longitud de 3000 Å y 15 Å de diámetro. Si la tropocolágena se -

mantiene a 40° durante un tiempo, según Piez, se separa en tres cadenas polipeptídicas conocidas como cadenas alfa, con un peso molecular de 95.000 - aproximadamente y formada por unos mil aminoácidos cada una de ellas.

Cada cadena alfa, según veremos, se pliega en una estructura helicoidal tipo poliprolina II y se reúne con dos más en la estructura supra helicoidal del tropocolágeno.

Como base para su estudio Ramachandran considera que para tomar - una molécula proteica como colágena, debe cumplir los siguientes seis puntos:

- 1) un tercio de los aminoácidos debe ser glicina y, aproximadamente un 20% iminoácidos.
- 2) en los estudios con rayos X de gran ángulo de difracción, ha - de aparecer un arco meridional de  $3 \text{ \AA}$  con puntos ecuatoriales a  $12 \text{ \AA}$
- 3) tener las fibras una periodicidad media de  $640 \text{ \AA}$  en el microscopio electrónico
- 4) presentar los radicales NH un desplazamiento de  $30 \text{ cm}^{-1}$  en el espectro infrarrojo en comparación con otras proteínas lo que hace aparecer, por tanto, la banda del NH a  $3.330 \text{ cm}^{-1}$ .
- 5) tener la molécula una rotación negativa de  $-350^\circ$  cuando está - en solución, disminuyendo a  $-120^\circ$  si se calienta por encima de la temperatura de transición
- 6) la molécula en su forma sólida, se acorta cuando se calienta y su imagen de difracción con rayos X se hace amorfa por encima de la temperatura de plegamiento. (142)

Como hemos señalado, la molécula de tropocolágena, que es la base de la microfibrilla, al desnaturalizarse por el calor se divide en tres - cadenas proteicas llamadas "alfa", que se diferencian entre sí por pequeñas variaciones en su composición de aminoácidos. El colágeno de la mayoría de las especies y tejidos está formado por dos cadenas:  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ .

Según Herring éstas no son las únicas cadenas que se pueden obtener a partir del colágeno, sino que se obtienen otras mayores de un peso molecular entre 200 ó 300.000. Las cadenas  $\beta$  que están formadas por la reunión de dos cadenas alfa de forma que  $\beta_1$  sería la reunión de dos cadenas  $\alpha_1$  y  $\beta_2$  representaría la unión de una cadena  $\alpha_1$  y una cadena  $\alpha_2$ ; por fin hay una forma  $\gamma$  que es la reunión de las tres cadenas  $\alpha_1$ . En estas formas  $\beta$  y  $\gamma$  las cadenas alfa están unidas por enlaces covalentes entre sí y son compuestos solubles. Según Piez, el que una molécula de colágena se haga insoluble es debido a un aumento de las uniones covalentes entre las diferentes cadenas, lo que parece contradecir, en algún sentido al menos, los datos de Prockop, etc., (140) .

Siguiendo a Barnes, el colágeno óseo está formado igual que el de la piel por dos cadenas  $\alpha_1$  y una  $\alpha_2$ . La cadena  $\alpha_3$ , descrita por Glimcher en el hueso, sería lo mismo que la cadena  $\alpha_1$  con un péptido corto unido al N terminal, que puede corresponder a una cadena  $\alpha$  de procógeno, precursor soluble del colágeno que presenta en los extremos de la cadena unos cortos péptidos que no entran a formar parte de la molécula definitiva. Según Kühn (135) el telopéptido N terminal tiene 3 funciones que describimos a continuación:

1. guiar el ensamblaje de las cadenas
2. una función de transporte que impide la formación intracelular de fibrillas colágenas insolubles.
3. la fibrillogénesis en un punto y momento determinado al liberarse el telopéptido.

Las cadenas de protocolágeno tienen, según Prockop, un peso molecular de 115 a 120.000, a excepción del colágeno de las membranas basales cuyo peso molecular asciende a 140.000. (133)

Los estudios con la colagenasa del clostridium histoliticum, dividen la cadena  $\alpha$  en 200 polipéptidos de 500 de P.M., la mayoría de los cuales son tripéptidos que, según Michael (144), presentan la glicina como aminoácido N terminal sustituida en ocasiones por la alanina. Gallop y otros autores, demuestran que los 2 tripéptidos que se encuentran con mayor frecuencia son: 1) glicina-prolina-alanina; 2) glicina-prolina-hidroxiprolina. Tras la digestión con colagenasa así como con proteasas, quedan una serie de fragmentos polipeptídeos no dializables, que corresponden a la parte no helicoidal de la molécula en su porción N terminal cuya estructura describiremos más adelante. Según Franzblau, el 50% de la molécula presenta un triplete repetido N veces cuya secuencia de aminoácidos es glicina-prolina y otro aminoácido variable. El 40% restante de la molécula estaría formada por secuencias polares de aminoácidos.

Las proteasas, según indica Nordwig, dividen la molécula colágena en péptidos que contienen todos glicina en su extremo N terminal y lisina o arginina en el extremo C terminal.

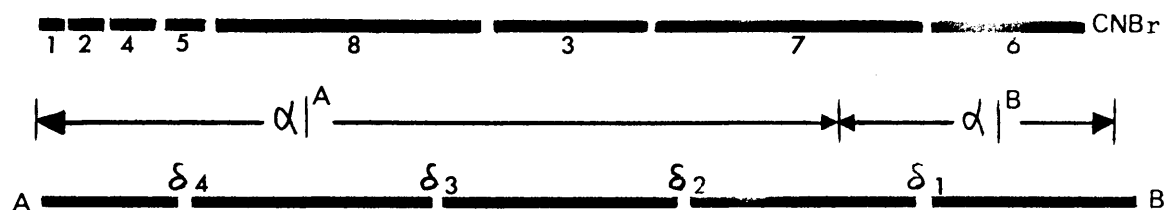
El 33% de los aminoácidos de la molécula es glicina, prolina o sus formas hidroxiladas, lo que sugiere que estos péptidos son estructuras proteicas cristalinas. Rubin, con las colagenasas demuestra la existencia de zonas no cristalinas con una composición en aminoácidos diferente por la ausencia de hidroxiprolina y una clara disminución de la glicina. Estos péptidos estarían situados en las zonas extremas de la molécula de colágeno que son los telopéptidos de Schmitt. Contienen los aldehídos responsables de los enlaces que se forman entre la cadena alfa y dan la antigenicidad de la molécula.

Por tanto, cada cadena  $\alpha$  tiene una porción central helicoidal formada por los tripletes glicina-prolina-x que, en ambos extremos, se termina

na en los telopéptidos N y C terminales, con una composición en aminoácidos diferente que no adoptan la forma helicoidal. En la zona N terminal, hay un péptido más que da la solubilidad de la molécula de procolágeno y se pierde para dar lugar al tropocolágeno.

Con el método del CnBr, Piez y cols. han estudiado totalmente las cadenas alfa del colágeno cutáneo de la rata, que son similares a las -- del colágeno del hueso de pollo. Según los datos de Miller para la  $\alpha$  1, y de Kang y Urist para la  $\alpha$  2, los péptidos se han denominado según se separaron por electroforesis; pero su orden dentro de la cadena  $\alpha$  es: 1, 2, 4, 5, 8, 3, 7, 6, según muestra la figura 7 donde observamos su correspondencia con las bandas  $\delta$ .

F I G U R A 7 ( tomada de Rojkind )



El primer fragmento obtenido de la cadena  $\alpha$  1 en su extremo N terminal, es el péptido específico del propocolágeno, aumenta la longitud de la cadena  $\alpha$  y no forma parte de la porción helicoidal de la misma. -- Tiene 15 aminoácidos de los cuales uno es una tirosina, menos del 30% es glicina, presenta menos prolina que el resto de las cadenas y no tiene hidroxiprolina. Hay además un único residuo de lisina que, según Piez, aparece en la posición 5 para el colágeno cutáneo, en tanto que, aparece en la posición 9 para el hueso. El grupo E amino de la lisina se oxida y da lugar a la alisina, que es el semialdehído del ácido  $\alpha$  aminoadípico, responsable de los enlaces intra e intermoleculares.

En el colágeno óseo, según Rojkind, por delante de los 15 aminoácidos de este primer fragmento se colocan 4 aminoácidos más que son: ácido pirrolidin-carboxilo, metionina, serina, tirosina y a continuación los 15 aminoácidos antes señalados, lo que hace retroceder la lisina a la posición 9 de la cadena. Otros autores señalan que estos cuatro primeros aminoácidos existen en todas las cadenas de procolágeno y su pérdida es un artefacto de preparación. Según Schofield, lo más característico de este péptido es la presencia de cistina y cisteína, que no aparecen en el tropocolágeno propiamente dicho. Hay además una mayor riqueza de aminoácidos ácidos. La porción C terminal de este péptido la forma el primer triplete glicina-prolina-x- .(119,133,135,142,144,146)

El péptido que le sigue en la cadena  $\alpha$ , tiene 36 aminoácidos y a su nivel comienzan los tripletes típicos glicina-prolina-x, o glicina-x-prolina y su variante hidroxilada. Es la zona del comienzo de la estructura helicoidal del colágeno. En el N terminal de la hidroxilisina de este péptido, según Buttler, se une de forma glucosídica un disacárido que es glucosa-galactosa. Todos los péptidos en su porción C terminal, excepto el último, presentan una homoserina o su lactona.

El último péptido aislado ( el 6 ) tiene 182 aminoácidos y es la porción C. Terminal de la cadena de tropocolágeno, presenta el otro residuo de tirosina de la molécula y, en el pollo, el colágeno óseo tiene un residuo de metionina. Desde los estudios de Künh se ha visto, que si no se emplean extractos ácidos la porción 6 es heterogénea en la vaca y es posible obtener una forma más larga con un suplemento de 15 aminoácidos -- que aparece tanto en las cadenas  $\alpha$  1 como en las  $\alpha$  2 en la zona C terminal y, por su susceptibilidad a las proteasas, etc., se considera no pertenecer a la estructura helicoidal de la molécula. Sería la porción responsable de la respuesta inmunitaria de las cadenas colágenas. (143)

Rautenberg ( 143) ha estudiado la porción C terminal caracterizada por: 1) de sus 21 aminoácidos sólo 2 son glicinas y presenta una li



sina a ocho aminoácidos del C terminal en la misma postura que aparece en el telopéptido N terminal; 2) la glicina es sustituida por alanina ; - 3) la porción C terminal tiene una tirosina-tironina según vemos en la figura 8.

#### F I G U R A 8 (tomada de Rautenberg)

glic---glic---tiros---aspar-----histid---aspar---glic---glic---arginina---tiros---tiros

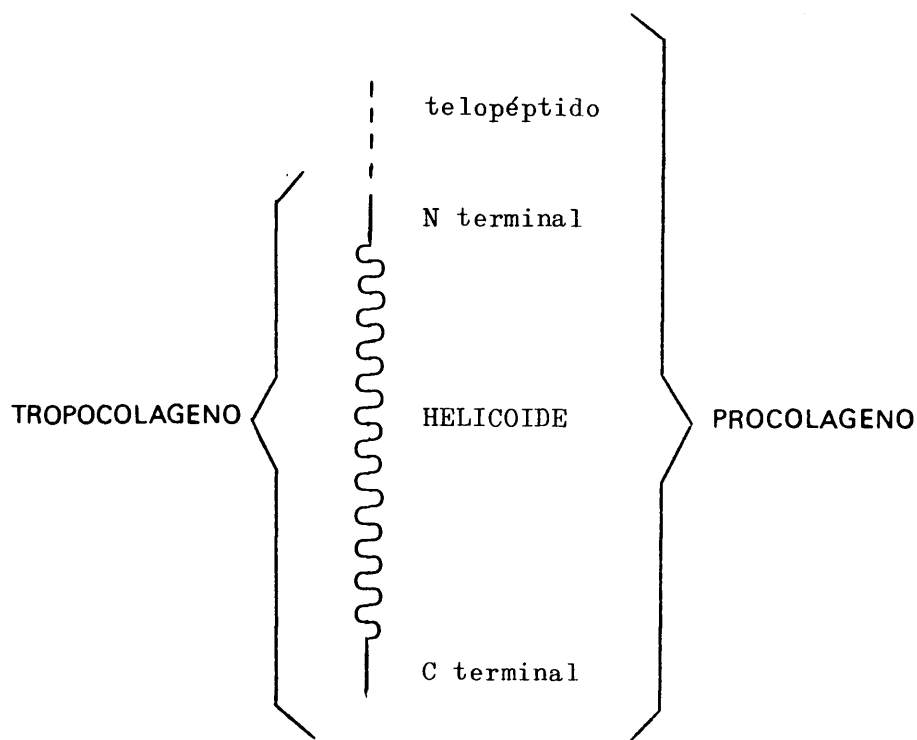
Aunque la cadena es más larga que la del extremo N terminal, muestran varias similitudes entre sí. La distancia entre la lisina y los ex-tremos de la cadena son iguales, hay una concentración relativamente grande de aminoácidos aromáticos. Hacia la porción helicoidal de la cadena, - los telopéptidos se continúan con una zona rica en aminoácidos no polares, ya que, hay 5 tripletes glicina-prolina-prolina con una hidroxilación variable de la prolina.

Los estudios comparativos con otras especies muestran que, conservando una cierta similitud, la composición de los telopéptidos C varía, - ya que, en el conejo, la cadena 6 sería en 2 aminoácidos más larga que en - el pollo y, tras la tirosina-tirosina, se uniría una alanina y una arginina. Glimcher en 1972 y Eyre , han encontrado en el hueso de pollo el mismo final tirosina-tirosina. (129)

Junto a su valor antigénico , en el que no entramos y del que existen varias revisiones ( 121) , las zonas N y C terminal son de gran importancia por tener lugar a su nivel los enlaces entre las diferentes cadenas alfa y explicar la reunión de las mismas en el helicoide de tropocolágeno.

- Ver figura 9 -

F I G U R A 9

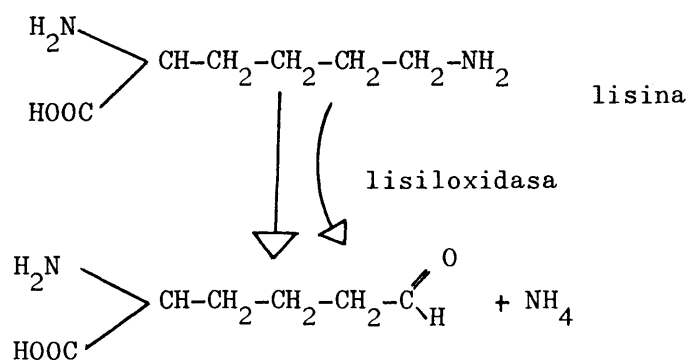


Parece aceptado que las zonas no helicoidales N y C terminal tienen como misión principal establecer los enlaces intercadenas, habiendo sido Rojkind en 1964 y Bornstein en 1966 los primeros en describirlo y asociarlo a la formación de aldehídos por la condensación de dos lisinas, pudiendo existir diversas variantes de este tipo de enlace.

Según Rautenberg estos enlaces pueden tener lugar dentro de una misma molécula de protocolágeno entre las cadenas alfa y, además, entre el extremo N terminal de una cadena de protocolágeno y el C terminal de una unidad vecina, lo que explicaría el ensamblaje de las mismas en la fibra. Estas últimas reacciones son, según Rasmussen y Prockop, extracelulares y para que tengan lugar es preciso la amino-oxidasa, que transforma el radical  $R-CH_2-NH_3$  en  $R-CHO + NH_4$  ( como vemos en la figura 10 ). ( 45, 142, 143 ).

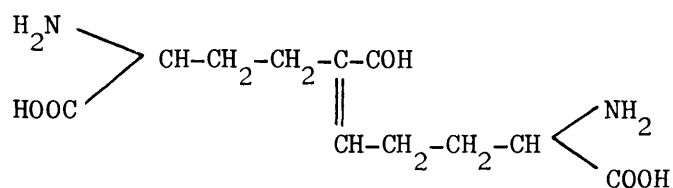
F I G U R A    10

1º



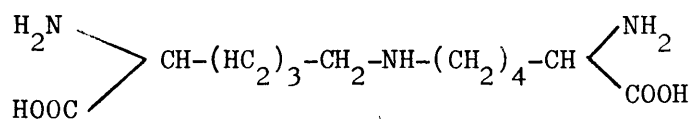
semialdehido del ácido  $\alpha$  aminoadípico

2º



Aldol resultante de la unión de 2  $\alpha$  aminoadípicos. En el punto de unión el doble enlace se puede sustituir por un hidroxilo.

3º



Lisonorlencina o base de Schiff reducida.

Esta reacción se inhibe, o al menos se retarda claramente en el latirismo. En la actualidad se piensa que la formación de aldehidos no es - el mecanismo inicial de unión entre las cadenas alfa, ya que, en el latirismo sigue existiendo el procolágeno con sus telopéptidos, según Martin, a pesar de la inhibición de la aminooxidasa. Según Kühn estas uniones transversales de las cadenas siguen 3 pasos:

- 1) formación del aldol por la lisil-oxidasa
- 2) unión de los aldoles de las cadenas vecinas formando las bases de Schiff
- 3) un tercer paso no conocido en que estos enlaces se estabilizan.

Según Prockop y Schoffield la unión de las cadenas se hacen por enlaces disulfuro, como se demuestra reduciendo las cadenas de procolágeno - con mercaptoetanol. Los mismos autores indican que la aparición de estos enlaces disulfuro, coinciden con la formación de la estructura helicoidal y favorecerían la reorganización de la misma, es decir, que la formación - de los enlaces disulfuro en la porción N terminal, no helicoidal, favorece la aparición de la estructura helicoidal. Los estudios de Mills y Baveta en 1968, señalaron la existencia de una forma de colágeno soluble previa que se sintetiza en la célula y se excreta al exterior, donde a continua - ción se ensambla. La formación de aldehidos tendría entonces lugar en el exterior de la célula, tras la pérdida del telopéptido N terminal, por ac - ción de la aminooxidasa, que actuaría sobre las lisinas o las hidroxilisinas durante un cierto espacio de tiempo provocando así la maduración del colá - geno. (133,135,137,141,146)

Una vez conocidos estos datos vamos a considerar brevemente la sín - tesis, el mecanismo de excreción de la fibra colágena y su estructura ex - tracelular.

Si hoy se conocen aproximadamente todos los pasos en la síntesis - del colágeno, en 1930 aún existía una discusión entre los diferentes auto - res según consideraran las células responsables o no de la formación de es

tas fibras, como apoyaban Bastfell y V. Mollendorf frente a los autores que aceptaban un papel rector de la célula en la síntesis del colágeno, existiendo la duda de si la célula sintetizaba la fibra completa o bien sólo formaban los precursores como señalaba Wollbach en 1933, precursores que, extracelularmente, crecerían para dar lugar a la fibra madura por polimerización. (119)

En 1956 Fitton Jackson aporta los primeros datos con el microscopio electrónico en cultivos celulares en los que se aprecia que la sustancia orgánica de la matriz ósea, tanto las fibras como los mucopolisacáridos, son de origen celular osteoblástico, y demuestra la existencia de fibrillas en el citoplasma celular del cuál pasan a la matriz ósea. (27)

Los estudios de Carneiro y Leblond ( 21 ) y sobre todo de las escuelas de Prockop y Kühn ( 133 ) dejan fuera de toda duda que el colágeno se sintetiza en el interior de la célula. Leblond y Weinstock ( 36 ) empleando glicina y prolina marcadas con tritio, han podido demostrar mediante estudios seriados que tras la administración del aminoácido, éste se incorpora a los osteoblastos, apareciendo ya a las seis horas en la sustancia fundamental y, como si la aposición ósea es constante en la zona estudiada, el área marcada queda más y más profunda en la región mineral.

Los estudios de Rohr y Frank combinando esta técnica con el uso del microscopio electrónico, han demostrado que el isótopo se localiza en el R.E. a los 5 minutos de la inyección, para acumularse después paulatinamente en los sáculos del aparato de Golgi y a los 24 minutos comenzar a mostrarse a nivel del osteoide. Rohr indica la posibilidad del paso directo desde el R.E. a la superficie celular.

Analizando el proceso más de cerca, podemos considerar que los diferentes aminoácidos que entran a formar parte de la cadena se activan al unirse a radicales activantes como el A.M.P., formando el aminoácido A.M.P. que se transfiere así al A.R.N. de transferencia y se une al A.R.N. mensaje

ro y éste al del ribosoma para dar lugar al polisoma. Goldberg y Fernández Madrid han encontrado que los polisomas, que dan lugar a la cadena naciente de colágeno, están formados por cadenas de 100 o más ribosomas unidos a las membranas del retículo endoplásmico ( 130 ) .

Urist ( 209 ) ha demostrado por marcado secuencial que las cadenas  $\alpha$  1 y  $\alpha$  2 se sintetizan como cadenas aisladas de manera paulatina, uniéndose un aminoácido tras otro y no como habían supuesto previamente - algunos autores; por formación de pequeños péptidos que se unirían a continuación entre sí.

Los estudios de Schofield y Prockop ( 146 ) han demostrado que - una vez que se ha sintetizado cada una de las cadenas  $\alpha$  de protocolágeno tiene lugar la formación de los puentes disulfuro, paso previo a la hidroxilación de la prolina y de la lisina, ya que, aparecen dichos enlaces a pesar de inhibirse específicamente las reacciones de hidroxilación.

La hidroxilación de la prolina, que los estudios de Udenfriend y Prockop ( 133 ) han demostrado producirse una vez que la cadena se ha - formado, se hace en posición trans como señala Priest ( 141 ) . La hidroxiprolina como tal, no se incorpora a la molécula de colágeno.

Prockop ( 146 ) ha localizado el enzima responsable de la hidroxilación de la prolina, la prolil-hidroxilasa, en las cisternas del R.E. -- Tiene  $85 \times 85 \text{ \AA}$  , está formada por 4 subunidades de  $40 \text{ \AA}$  de diámetro y es más afín a las cadenas de protocolágeno cuanto más largas sean éstas. -- Prockop señala que posiblemente actúe desplazándose a lo largo de la molécula de protocolágeno. Es un enzima que trabaja como oxidasa y deshidrogenasa según Priest. Para que funcione exige la presencia de oxígeno, ácido <sup>o</sup>escárbico como agente reductor, Fe ionizado, y la tranformación de una molécula de ácido cetoglutárico en ácido succínico con liberación de una - molécula de CO<sub>2</sub> por cada hidroxiprolina formada, según Udenfriend quien - señala, además, que la concentración de cetoglutárico en la célula depende de la presencia de Ca<sup>++</sup> . Prockop afirma que son reacciones diferentes a

las del ciclo de Krebs.

La hidroxilación de la lisina tiene lugar por un enzima diferente, la lisil-hidroxilasa, pero que precisa los mismos sustratos que la prolil-hidroxilasa para su acción. No todas las prolinas de una cadena colágena se hidroxilan, la transformación tiene lugar sólo en los residuos de prolina que preceden a uno de glicina en la molécula.

Parece que hay aproximadamente 100 hidroxiprolinas por monómero de protocolágeno, y sin su hidroxilación y la incorporación del azúcar, no se secreta el procolágeno al exterior de la célula por ser necesarios para la estabilización de la estructura helicoidal. Cuando se ha completado el enrollamiento de la molécula se inhibe su hidroxilación, tras la cuál, se incorporan a la molécula colágena los radicales glucosídicos. La glucosa y galactosa activadas y unidas al U.D.P. forman la U.D.P. -glucosa y la -- U.D.P. galactosa, que por acción de la U.D.P.-transferasa se engarzan a la hidroxilisina, requiriendo para su activación la presencia de Mn. Se une primero la galactosa y en los puntos donde se localiza ésta se incorpora a continuación la glucosa. La unión glucosa-galactosa se hace por enlace glucosídico  $\alpha$  -1-2. No todas las hidroxilisinas se glucosidan, y los estudios realizados por los diferentes autores parecen indicar que el azúcar se incorpora en los puntos de la molécula de colágeno con la secuencia : - hidroxilisina-glicina-histidina-arginina o similar, pero siempre con la arg<sup>1</sup>irina en tercera posición tras la hidroxilisina.

La formación de la hélice triple tiene lugar en el interior de la célula y, aunque no hay acuerdo entre los diversos autores, parece que a medida que se sueltan las cadenas  $\alpha$  de las poliribosomas, se van ensamblando a partir del extremo N terminal. Proceso diferente a la formación de las fibrillas de colágeno en el exterior de la célula, como después veremos.

Estos pasos son necesarios para la secreción del procolágeno, que puede hacerse por eliminación previa al citostal y, desde éste, a través

de la membrana celular al medio, como señalan los estudios de Fitton Jackson, o por excitosis de las vesículas del aparato de Golgi. En apoyo de esta manera se encuentran los datos de Digelman (141) que muestran, que tras la destrucción de los microtúbulos intracelulares con vinblastina se impide la secreción del procolágeno. En el hueso, aunque hay datos en contra, la opinión de la mayor parte de los autores siguiendo a Prockop indican que el procolágeno es secretado por el osteoblasto, y en la zona extracelular inmediata a la membrana se elimina, por enzimas del medio, el telopéptido de la porción N terminal, transformándose así el procolágeno en tropocolágeno cuya evolución ulterior describiremos ahora. El enzima proteolítico, la procolágeno peptidasa, que libera el telopéptido pueden localizarse en diferentes puntos extracelulares y determinar así en qué lugar de la matriz se depositará la fibra colágena. (45,129,137,141,146)

Las fibras del tropocolágeno se asocian espontáneamente por la acción recíproca de grupos ionizados de moléculas adyacentes. Los segmentos N y C terminales que no entran a formar parte de la cadena helicoidal de la molécula, son responsables de la agregación a través de la formación de aldehídos, como señalábamos antes. Por otro lado los azúcares también toman parte. En las cadenas  $\alpha 1$  de la piel de rata, el único disacárido que aparece se localiza a 300 Å del N terminal, lo que corresponde a la zona de unión demostrada entre dos moléculas de colágeno adyacentes.

La formación extracelular de las fibras, a partir de las unidades de tropocolágeno, está influida por la presencia de mucopolisacáridos que aceleran la reunión de las fibrillas.

Una vez liberado del procolágeno el telopéptido N terminal, quedan las moléculas insolubles de tropocolágeno que tiene una longitud de 2.800 a 3000 Å y 14 Å de diámetro, con un P.M. de 300.000. Se consideran cristaloideos al ser moléculas de estructura muy simétrica, unidas entre sí por enlaces de varios tipos.

La estructura molecular que se acepta en la actualidad está basada



principalmente en los datos de Ramachandran (142 ) y la Escuela de Madrás, quienes en 1954 fueron los primeros en considerar que el tropocolágeno estaba formado por una triple cadena helicoidal. A partir de este modelo se -- han propuesto variantes como la de Rich y Crick y los de Szent-Györgi (45 144) etc..

En cada cadena  $\alpha$  todos los autores aceptan que la hélice, en las -- llamadas regiones cristalinas, es debida al triplete glicina-X-Y, o glicina --prolina-X, siendo X, Y, dos radicales aminoácidos diferentes. La glicina se coloca hacia el eje con sus grupos NH hacia fuera para la formación de -- los enlaces de hidrógeno con el radical C=O de las cadenas vecinas.

Lo que varía de unos modelos a otros es la colocación del triplete prolina-hidroxiprolina y así Ramachandran propone en su triplete una secuencia de glicina-prolina-X. Los estudios de la Escuela de Bornstein con el -- CNBr, muestran que un 60% de los tripletes son glicina-prolina-X y que esta secuencia permite dos enlaces de hidrógeno por triplete entre las cadenas, -- lo que concuerda con los datos de Ramachandran. Crik (144B) considera que sólo se puede formar un enlace de hidrógeno por cada triplete y en estos la glicina ocuparía el segundo puesto, sería prolina-glicina-prolina, colocán--dose el N-H en sentido de las agujas del reloj. En el estudio de polímeros artificiales glicina-prolina-X se encuentra que el N-H del segundo aminoáci--do se orienta hacia el eje de la cadena y no puede entonces formar el segun--do enlace de hidrógeno, lo que sí es posible si el triplete es glicina-gli--cina-prolina. Los estudios de Harrington y cols. con difracción de rayos X, de infrarrojos y de intercambio de deuterio, señalan que es más probable la existencia de dos enlaces de hidrógeno por triplete y la estructura pro--puesta por Ramachandran. Una particularidad de estas estructuras, según Ra--machandran y Grant, es que los enlaces de hidrógeno no se forman en el inte--rior de una misma cadena  $\alpha$  . La traslación de los aminoácidos respecto al eje es de  $2,96 \text{ \AA}$  entre aminoácidos, el ángulo de inclinación del triplete es de  $30^\circ$  aproximadamente y cada triplete se repite cada  $9,5 \text{ \AA}$ , es decir, un giro completo de la cadena incluye 3,3 aminoácidos.

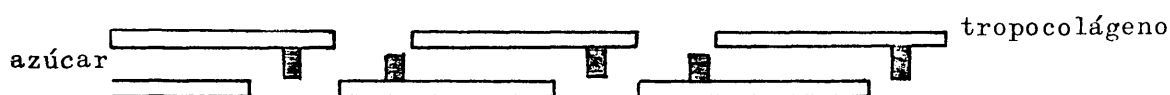
Al margen de los enlaces de hidrógeno, el contenido en prolina influye también en la estructura helicoidal, según los datos de Szent-Györgi y Harrington. En el colágeno un 20% de los aminoácidos es prolina o hioxiprolina y se ha demostrado que las cadenas de poliprolina forman una hélice levogira sin necesidad de enlaces de hidrógeno. La estructura helicoidal se estabiliza por la colocación del átomo de N en el anillo pirrólico, limitando así la posibilidad de giro, y el grupo C=O forma enlaces de hidrógeno de gran fuerza con los grupos N de las cadenas vecinas. Se explican así los cambios de longitud de la molécula con la temperatura y así, - la temperatura de plegamiento, según ha demostrado Gustavson (135), está en relación directa con el contenido total de anillos de pirrolidina de la cadena.

Las tres cadenas alfa se unen entre sí para formar el tropocolágeno en una hélice dextrogira con un ciclo que se repite cada 104 Å, incluyendo 36 aminoácidos en cada giro, con un total de 100 vueltas.

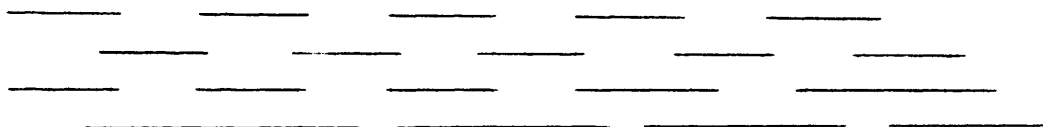
Las moléculas de tropocolágeno se agregan extracelularmente para formar microfibrillas, lo que sucede por la acción recíproca de grupos cargados de moléculas adyacentes dependiendo del pH y de la concentración de iones. La supresión de las zonas no helicoidales de la molécula, inhibe la formación espontánea de las microfibrillas.

El telopéptido N terminal inicia la formación de las microfibrillas, como señala Speakman 1971 (147), y el telopéptido C terminal es el responsable de su grosor, además, como ya hemos señalado más arriba, los azúcares influyen también en la configuración de la fibrilla al colocarse en 90° respecto al eje del tropocolágeno y aparecer a 300 Å del N terminal. Para algunos (45) este radical glucosídico se coloca en los espacios que quedan entre las cadenas vecinas del tropocolágeno como muestra el esquema 11.

#### ESQUEMA 11



Las unidades de tropocolágeno se reúnen en grupos de 5 formando un cilindro hueco de  $44 \text{ \AA}$  de diámetro y de longitud variable según los tejidos. En el sentido del eje de la molécula, cada una de ellas se encuentra separada de la siguiente por un espacio de  $400 \text{ \AA}$ , en el cuál se colocaría el azúcar antes señalado. Petruschka y Hodge ( 139 ) indicaron que el origen de la estriación periódica de  $640 \text{ \AA}$  que representan las fibras, se debe a la colocación escalonada de unas moléculas de tropocolágeno respecto a otras en las fibrillas como podemos ver en la figura 12.



(Fig. 12)

El problema de este esquema es que se refiere sólo a dos planos del espacio y hemos de considerar el colágeno como una estructura tridimensional, por lo que Schmitt ( 45 ) propone la colocación de las unidades de tropocolágeno en cilindro donde conservan la disposición escalonada. Las microfibrillas se reúnen para formar fibrillas de  $150$  a  $1500 \text{ \AA}$  de grosor, con una longitud variable en las cuales se sigue manteniendo la disposición ordenada de las moléculas y la periodicidad de las fibras.

Tiene interés, una vez expuestos todos estos datos, conocer si el colágeno óseo se diferencia del de los tejidos blandos. Como ya dijimos, en la actualidad todos los autores aceptan que está formado por la reunión de dos cadenas  $\alpha_1$  y una  $\alpha_2$ . Los análisis de los aminoácidos, según Barnes ( 128 ) indican una misma composición que en la piel; pero Mechanic, Prockop, etc., ( 136 ) señalan la presencia de una microheterogeneidad del colágeno, que se debería a una colocación variable de los aminoácidos en la molécula.

Por otro lado Barnes, Glimcher, Mechanic ( 129 ) señalan que el colágeno óseo presenta más radicales de hidroxilisina que el colágeno cutáneo, y que en el embrión la porción N terminal presenta un 50% de sus lisi-

nas hidroxiladas. Esta diferencia es dependiente de la edad, ya que, en animales mayores la diferencia es menos marcada para presentar en los huesos osteoporóticos, según Igaradhi ( 134 ) un nuevo aumento de hidroxilisinas por molécula.

La presencia de un mayor número de radicales hidroxilados tiene importancia porque permitiría la formación de un mayor número de enlaces entre moléculas. Así, los análisis de estos autores indican que el colágeno óseo presenta una mayor cantidad de dihidroxilisinoonorleucina, base de los enlaces aldólicos entre moléculas vecinas. Este mayor número de enlaces sería responsable de la mayor insolubilidad del colágeno óseo y, explica según Glimcher ( 32 ) , que sea más fácilmente extractable con desnaturalizantes proteicos.

La mayor cantidad de hidroxilisinas explica así mismo, que el colágeno presente un mayor número de radicales glucosídicos de los cuales, el más frecuente, es el glucosil-galactosa-lisina frente al galactosil-hidroxilisina, que sería más abundante en los colágenos de los tejidos blancos.

### Calcificación

Para comprender en la actualidad los mecanismos de calcificación , en lugar de hacer una comparación entre las diferentes teorías que se han emitido, vamos a hacer primero una revisión muy somera de los mecanismos de acumulación del  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{PO}_4^-$  por las células y su paso a través de las membranas celulares e intracitoplasmáticas, para ocuparnos después de los mecanismos celulares de deposición del  $\text{Ca}^{++}$  y las condiciones de la sustancia fundamental que determinan estos depósitos.

El estudio del metabolismo del calcio está en relación con los otros equilibrios iónicos celulares en los que no vamos a entrar más que en lo estrictamente necesario. Siguiendo el esquema de Borle (159) el  $\text{Ca}^{++}$  es imprescindible para una serie de reacciones y sigue a través de las membranas celulares una serie de movimientos.

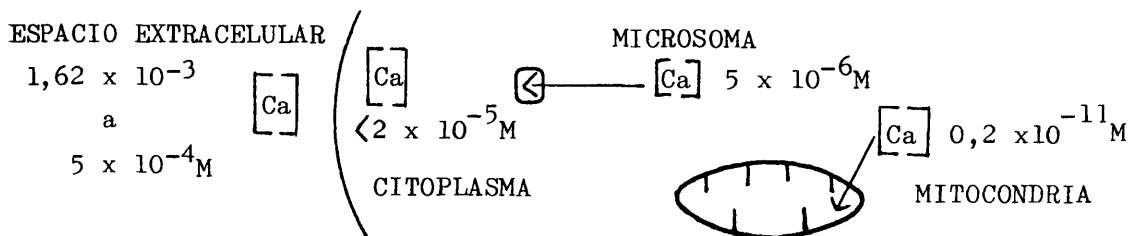
El paso del  $\text{Ca}^{++}$  a través de las membranas puede ser un transporte activo o pasivo, siendo activo aquél proceso que precise una liberación de energía para producir movimiento de partículas a través de una membrana.

Hay que conocer, por tanto, la termodinámica del calcio para saber si sus movimientos a través de las membranas son un proceso activo o pasivo. El paso de un ion a través de una membrana, depende de la permeabilidad de la misma y de las fuerzas que actúan sobre el ion.

El  $\text{Ca}$  puede presentarse de forma ionizada, de forma compleja, o unido a las proteínas. De estas formas, la que nos interesa es la que Neuman ha denominado como  $\text{Ca}$  activo que es la forma ionizada  $\text{Ca}^{++}$ . Las medidas de  $\text{Ca}^{++}$  para el espacio extracelular da un valor de  $4,7 \times 10^{-3}\text{M}$  para Neuman, en tanto que para Mc Lean y Hastings es de  $1,62 \times 10^{-3}\text{M}$  y para Rasmussen de  $5 \times 10^{-4}\text{M}$ . (45,189)

Los estudios del  $\text{Ca}$  intracelular se han hecho principalmente en células nerviosas y musculares, partiendo de los trabajos de Hodgkin, Keynes Lewis, etc., que muestran que en el axon el  $\text{Ca}^{++}$  alcanza un valor de  $10^{-5}\text{M}$ . Los estudios para el músculo muestran que la concentración en su citoplasma es menor de  $2 \times 10^{-5}\text{M}$ . La conclusión a la que se llega comparando estos valores, es que hay un mecanismo activo celular que expulsa el  $\text{Ca}$  al exterior de la célula en contra de un gradiente.

Dentro de la célula el  $\text{Ca}$  no se distribuye de una manera uniforme en los distintos compartimientos intracelulares como se ve en el esquema - 13.



En la célula se une a una serie de compuestos, en general macromoléculas que forman, de acuerdo con la intensidad de su unión, depósitos intracelulares más o menos estables. El  $\text{Ca}^{++}$  libre modifica las condiciones de permeabilidad de la membrana. Estudios con modelos de membrana han demostrado que el  $\text{Ca}^{++}$  se une de forma competitiva con el  $\text{K}^+$  y el  $\text{Na}^+$  a los fosfolípidos de la membrana, dándole mayor rigidez. Según Tobias el  $\text{Ca}^{++}$  se combina con la fosfatidil-serina y los datos de Kawasian señalan que la asociación y la unión cruzada de los grupos fosfóricos de los lípidos de la membrana con el  $\text{Ca}^{++}$  extracelular, determinan que la misma tenga un menor grado de hidratación que explicaría un descenso en el intercambio del  $\text{Ca}^{++}$  ionizado intracelular, es decir, una menor permeabilidad. (45,160).

El gradiente del  $\text{Ca}$  entre la célula y el líquido extracelular l.e. c., se explica por un mecanismo activo de expulsión del  $\text{Ca}$  cuya energía se obtiene por la hidrólisis del A.T.P. y se inhibe por la acción del mersalil y de los reactivos que se unen a los grupos S.H.. El K.m. de la membrana citoplasmática para el  $\text{Ca}$  es de 1 a  $50 \times 10^{-7} \text{ M}$ , y la intensidad del flujo es aproximadamente  $0,01$  a  $5 \text{ pM cm}^{-2} \text{ sg}^{-1}$ .

Este flujo a través de la membrana citoplasmática es menor que el flujo a través de las membranas intracelulares, lo que está en relación con el fenómeno antes señalado de que el  $\text{Ca}$  extracelular modifica la permeabilidad de la membrana citoplasmática. La activación de la adenil ciclasa por el primer mensajero y la formación de 5 AMP-cíclico, determina el aumento de la concentración de  $\text{Ca}$  en el citosol por un aumento de la permeabilidad de la membrana. Hay que señalar que el  $\text{PO}_4^-$  atraviesa pasivamente las membranas acompañando al  $\text{Ca}^{++}$ .

El transporte del  $\text{Ca}^{++}$  influye también sobre los transportes del  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , porque el aumento del  $\text{Ca}$  extracelular al unirse con los fosfolípidos de la membrana, disminuye la permeabilidad de ésta para los iones monovalentes.

Las estructuras subcelulares en las que el  $\text{Ca}$  se acumula con preferencia, son el retículo endoplásmico y las mitocondrias, como muestran los estudios en la fibra muscular estriada y en los axones.(159,160,163).

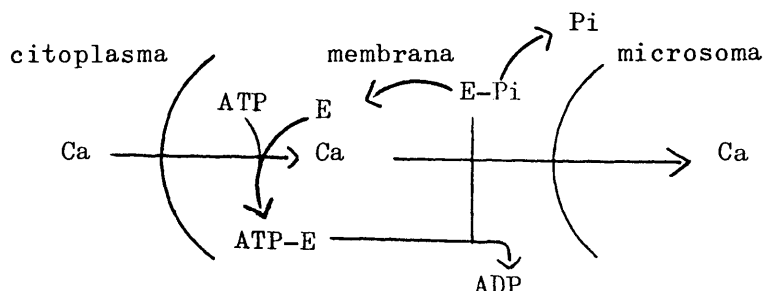
A nivel del retículo endoplásmico, las vesículas microsómicas son capaces de acumular  $\text{Ca}$  contra un gradiente electroquímico, y la energía precisa para hacerlo se obtiene de la degradación del A.T.P., según Endo y Hasselbach, lo cual se hace en presencia de  $\text{Mg}^{++}$ . La primera fase del paso al interior del microsoma se hace en la superficie externa de su membrana y depende, a su vez, de la presencia de  $\text{Ca}^{++}$  en el citosoma. Según Hasselbach, 1 mol de A.T.P. transporta 2 moles de  $\text{Ca}$  y precisa la activación de una A.T. Pasa. El transporte se hace con una concentración óptima entre  $5 \times 10^{-6}$  y  $5 \times 10^{-5}$  M de  $\text{Ca}$ .

"In vitro" se ha observado que el oxalato, el fosfato y el pirofosfato aumentan considerablemente la aceptación del  $\text{Ca}^{++}$  por los microsomas, en los que se combinan produciendo depósitos de compuestos cálcicos con lo que disminuye la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  en el microsoma y permite un mayor paso de  $\text{Ca}$  a su interior. Martinoni ha demostrado que al margen de otras sustancias como la EDTA, la fosfolipasa C disminuye la absorción del  $\text{Ca}$  y la concentración de lecitina en la vesícula microsomal. Este autor ha aislado una A.T.Pasa que se activa por el A.T.P. y  $\text{Mg}^{++}$  y que sería el transportador del  $\text{Ca}$  al interior de la vesícula.

Existe una discrepancia entre los autores que se han ocupado del tema, ya que, unos consideran que es un proceso de unión del  $\text{Ca}$  a un compuesto de la membrana microsomal, como Ebashi, en tanto que otros como Hasselbach lo consideran un transporte activo. Para los primeros el paso

del Ca a la vesícula es demasiado rápido para explicar un transporte activo, y para los segundos hay demasiada cantidad de Ca como para explicar su unión a los componentes de la membrana. Existen datos a favor de ambas teorías, así Ebashi ha demostrado que la velocidad de captación es de  $3 \times 10^{-9} \text{ M.cm}^{-2}.\text{sg}^{-1}$ , y según él, el A.T.P. se une a su enzima degradante de la membrana que queda así modificada para captar con gran rapidez el Ca. En una segunda fase el enzima se une al  $\text{PO}_4^-$  con liberación de A.D.P. y paso del Ca al interior de la vesícula. A continuación el enzima libera al  $\text{PO}_4^-$  y vuelve la membrana a su estado de permeabilidad primitivo, según muestra el esquema 14.

#### E S Q U E M A 14



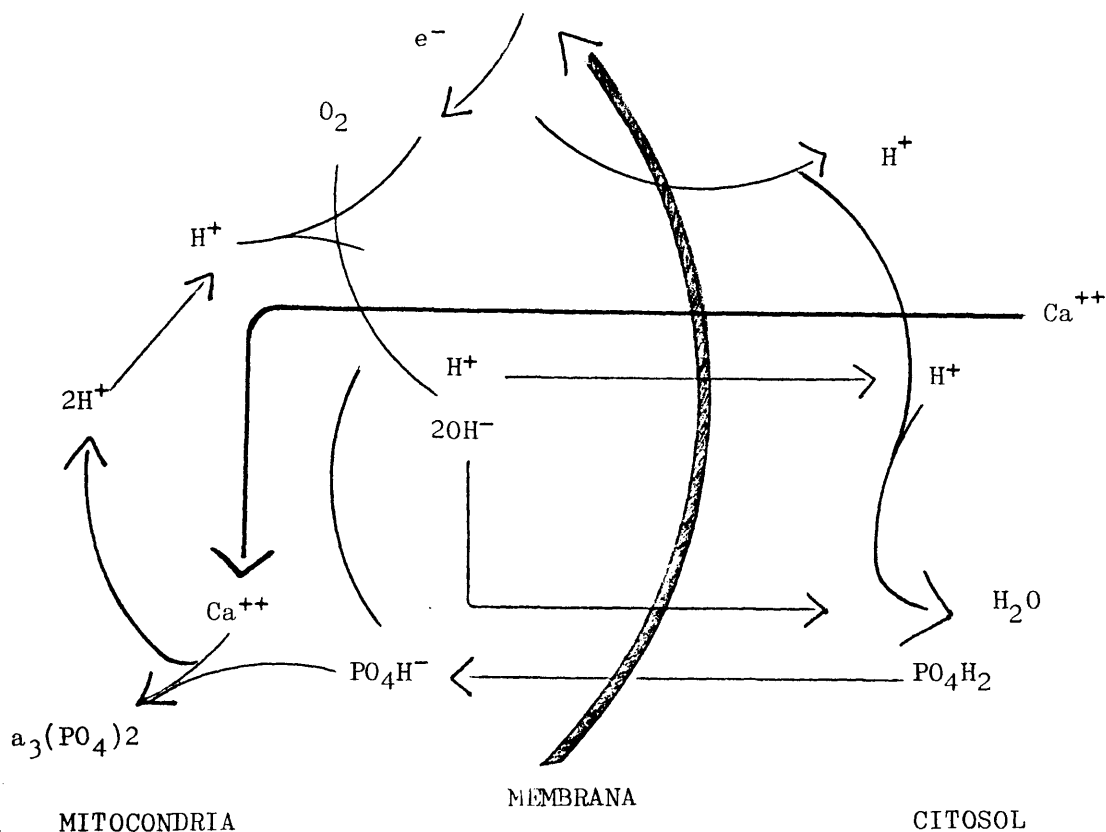
A nivel de las mitocondrias el  $\text{Ca}^{++}$  está a una concentración de  $0,2 \times 10^{-11} \text{ M}$ . Los trabajos de Rasmussen y Chance han demostrado que la concentración del Ca intramitocondrial está en relación directa con el transporte de hidrogeniones a través de su membrana y los estudios de Borle, Chance, Adler, Rasmussen (45,160), etc., han demostrado que además de diferencias en la concentración del Ca en los diferentes espacios celulares, hay gradaciones del pH a estos mismos niveles y el pH de las mitocondrias es más elevado que el del citosol, lo que según Mitchell se debe a los procesos de oxidación fosforativa. Los trabajos de Mathews y Martin (39,50) y de Stuffedin (206) demuestran que se pueden diferenciar por ultracentrifugación 2 tipos de mitocondrias, que el segundo clasifica como pesadas o ligeras, según sean o no capaces de absorber y depositar el cal\_



cio como ahora veremos.

El paso del Ca al interior de las mitocondrias es un proceso que requiere energía que puede tener varios orígenes, no sólo de la lisis del A.T.P. como en los microsomas, sino además por oxidación de sustrato, o -- partir del N.A.D.H. Según Rasmussen (fig. 15) el primer paso es la ex - pulsión del  $H^+$  de la mitocondria al citosol, asociado a un transporte de - electrones para poder reducir 2 hidroxilos y se acompaña de una transfor - mación de A.T.P. en A.D.P. La expulsión de  $2 OH^-$  introduce en la mitocon - dria  $PO_4H_2$ . En el citosol los dos  $OH^-$  se combinan con un  $H^+$  para dar lu - gar a  $H_2O$ . En la mitocondria el  $PO_4H_2$  se transforma en  $PO_4H^-$  y un  $H^+$ . - Los  $H^+$  se intercambian por  $Ca^{++}$  del exterior y, como el pH en el interior de la mitocondria es más elevado, el  $Ca^{++}$  acumulado se transforma en Ca - inerte al precipitar en forma de fosfatos, según Rasmussen siguiendo la -- reacción:  $3 Ca^{++} + 2 PO_4H^- \rightarrow Ca_3 (PO_4)_2 + 2 H^+$

#### ESQUEMA 15



Rasmussen ( 45 ) etc., han demostrado la existencia de gránulos densos en el interior de las mitocondrias con una relación Ca/P similar a la de la hidroxiapatita.

Aunque De Luca y Engström argumentan que esos estudios se han realizado en medios "in vitro" con un exceso de  $\text{Ca}^{++}$ , se han podido demostrar "in vivo" los mismos procesos. (171)

El  $\text{PO}_4^-$  entra, como ya hemos señalado, pasivamente siguiendo el movimiento del Ca y en general de los cationes. El paso se hace con un flujo de  $200 \text{ pM cm}^{-2} \text{ sg}^{-1}$ . La concentración de  $\text{PO}_4^-$  determina la intensidad del flujo de Ca, pues aunque en su ausencia se mantiene un transporte de Ca, al llegar a un nivel mínimo de concentración en la mitocondria cesa su paso. En presencia de  $\text{PO}_4^-$  el  $\text{Ca}^{++}$  se deposita haciéndose inactivo, disminuye así la concentración en la mitocondria y permite mantener el flujo de Ca hacia su interior. Además, en las mitocondrias el Ca puede unirse a los lípidos y a las proteínas con una mayor afinidad por los fosfolípidos. Según Chance y Borle habría una primera fase en la que el Ca se une a un punto de la membrana, a continuación pasa a través de la misma, momento en el que se produce una liberación de energía. En el tercer paso se libera el Ca al interior de la mitocondria, donde combinándose con el  $\text{PO}_4^-$  precipita en compuestos similares a la hidroxiapatita. Sería, pues, un mecanismo análogo al que hemos descrito para la membrana microsomal.

Junto a la unión del  $\text{Ca}^{++}$  a los lípidos, Panfili (191) y cols. han demostrado en las mitocondrias la presencia de una glucoproteína muy rica en ácido glutámico, que intervendría específicamente en el transporte del calcio al interior de la mitocondria.

La membrana de la mitocondria responde a las variaciones del A.M.P. cíclico en el sentido de que, cuando por la adenilciclase se produce un incremento del A.M.P., aumenta también la permeabilidad de la membrana mito\_

condrial para el Ca, que pasa del interior de la mitocondria al citosol. - No entramos en la regulación hormonal del Ca y P, ya que, sale totalmente de nuestro tema.

De todos estos datos sacamos en conclusión que el Ca pasa pasivamente a la célula de donde se expulsa activamente al líquido extracelular o se acumula en su interior en las vesículas microsómicas y en las mitocondrias en forma de compuestos cálcicos, inactivos desde el punto de vista iónico, por unión a moléculas orgánicas como los fosfolípidos, con los cuales interacciona a nivel de la membrana cambiando su permeabilidad. En presencia de  $\text{PO}_4^-$  se deposita en forma de fosfatos cálcicos que parece presentar la estructura de la hidroxiapatita. El  $\text{PO}_4^-$  sigue pasivamente al Ca cuyos movimientos determina en función de su concentración en el citosol y en el interior de la mitocondria, estando en relación con la producción de hidrogeniones.

Si consideramos el hueso como un órgano de depósito mineral, sus células tendrán como misión específica la acumulación extracelular del fosfato cálcico formado en su interior por extrusión de los complejos localizados en las mitocondrias y en el RE, así como la reabsorción de estos depósitos para mantener el nivel plasmático del Ca y P.

Siguiendo a Howell (177) podemos definir el proceso de acúmulo mineral extracelular - la mineralización - como el depósito en una matriz orgánica de la fase mineral, difícilmente soluble y similar a la hidroxiapatita, como sucede en los diferentes puntos de neoformación ósea.

Según los datos existentes en la actualidad nos tenemos que ocupar; por un lado de los fenómenos celulares ya sugeridos por Wat en 1924, quién fue el primero en señalar la posible función osteoblástica en los procesos de calcificación; y por otro hemos de considerar las relaciones que adquiere el mineral con la matriz orgánica y las modificaciones extracelulares que sufre.

Ya hemos visto como el Ca y P se acumulan en la célula, en el retículo endoplásmico y en las mitocondrias. Tiene interés para nosotros - estudiar lo que sucede en el hueso, cartílago y dientes, en el interior - de cuyas células, hasta fecha muy reciente, no se había podido demostrar la presencia de Ca y P.

Entre las zonas que pueden tener interés para el estudio de la - calcificación, la más estudiada ha sido el cartílago de conjunción, por - la progresión reglada de los fenómenos de calcificación. Se han empleado así mismo, los sistemas de calcifilaxis de los tejidos blandos por su más fácil preparación y análisis. (151, 152, 153B, 158, 167, 174, 175, 204)

Los datos de Bonucci, Anderson, Kashiwa, Mathews y Martin (22, 148, 156, 158 ) demuestran que en el cartílago de conjunción antes de comen - zar la calcificación se cargan las mitocondrias de gránulos de  $\text{PO}_4^-$  y  $\text{Ca}^{++}$  cuyo número aumenta desde la zona en reposo hasta la zona hipertrófica pa - ra disminuir de una manera brusca en la zona de calcificación provisional. Esto parece indicar que las mitocondrias juegan un papel fundamental en - el proceso de mineralización, bien directamente por expulsión de los grá - nulos, o bien por transmisión de calcio a unas vesículas que son expulsa - das por la célula a la matriz ósea donde se acumula.

Los estudios de Mathews con  $\text{Ca}^{45}$  confirman dicha secuencia en el cartílago con paso del isótopo desde el interior de la célula hasta la ma - triz orgánica. En animales raquíticos con dosis bajas de  $\text{PO}_4^-$  la apari - ción de los gránulos de fosfato cálcico en las mitocondrias, en el retícu - lo endoplásmico y en las vesículas extracelulares, es escaso, recuperando un nivel normal en el momento en el que se aportan los elementos deficien - tes. Arsenis ha demostrado que las mitocondrias en las zonas del cartíla - go hipertrófico son más ricas en fosfatasa alcalina y pirofosfatasa, que en los otros puntos del tejido ( 183, 186).

Bernard y Pease ( 22, 50 ) han descrito en la periferia de los -

osteoblastos y odontoblastos, la existencia de extrusiones citoplasmáticas que terminan por liberarse de la célula y que están cargadas de  $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$  la membrana de estas vesículas es fosfolipídica. Robinson en 1966 ya había descrito la presencia de gránulos densos en el interior de las mitocondrias de los osteoblastos. Salomón y Ray ( 202 ) demostraron la presencia de  $\text{Ca}^{45}$  en la zona de los grandes condrocitos y señalaron la importancia de estas células como intermediarias del metabolismo cálcico, encontrando una gran parte del material radioactivo en relación con las células. Utilizando técnicas histoquímicas Kashiwa ( 19,179 ) con el G.B.H.A. y el acetato de plata, demuestra en 1966 y 1970 la presencia de Ca y P respectivamente en el interior de las células y en la matriz de los tejidos calcificables, en especial en el cartílago. Estos compuestos fosfocálcicos están en relación con la presencia de lípidos que ya habían sido descritos por Irwing y Wuthier (181,182 ). Kashiwa (179 ) demuestra con el Sudan negro la presencia de unos gránulos en el citoplasma y en la matriz perilacunar, en la zona de calcificación provisional. Con el G.B.H.A. pone de manifiesto la existencia de gránulos rojos en la matriz calcificada, y antes en el citoplasma de las células en la zona del cartílago hipertrófico y calcificado, así como en los osteocitos y osteoblastos. Con el método del  $\text{NO}_3\text{Ag}$  se puede determinar, de la misma manera, la presencia de  $\text{PO}_4^{--}$  y  $\text{CO}_3^{--}$  que aparecen en los puntos, donde antes, con el G.B.H.A. se demostraba la presencia de  $\text{Ca}^{++}$ . Kashiwa llega a la conclusión de que las células de fosfato cálcico forman gránulos de 0,5 a 1  $\mu$  de diámetro cubiertos con una membrana lipídica, que se expulsan a la matriz donde se reúnen entre sí para formar los grandes cristales. Los datos anteriores indican que el compuesto cálcico recién depositado se encuentra en un estado lábil y sus caracteres tintoriales señalan que no se trata de una hidroxiapatita. Estos complejos aparecen unidos a compuestos orgánicos en el interior del citoplasma. Compuestos que forman una membrana y que al teñirse con el Sudan negro y no destruirse con la hialuronidasa parecen estar formados por fosfolípidos.

Los datos de Irwing ( 181) indican la presencia en los tejidos -

calcificables de fosfolípidos en relación con el comienzo de la calcificación. De estos fosfolípidos parece que los más importantes son los fosfolípidos ácidos como la fosfatidilserina y el fosfatidilinositol, que desaparecen totalmente cuando la calcificación se completa. Según Irwing y Wuthier, los fosfolípidos son los responsables de la estabilización del fosfato cálcico amorfo recién excretado. Vogel en 1971 (210) encuentra también fosfolípidos en el interior de bacterias capaces de acumular fosfato cálcico.

De acuerdo con estos datos Brighthon y Hunt en 1974 ( 235 B ) - con piroantimonato potásico, han demostrado que estos gránulos aparecen en la fisis, en la zona de las células proliferantes, en las mitocondrias y en el interior de vesículas lipídicas. Aumentan en la zona del cartílago hipertrófico para pasar del interior de las células a la matriz orgánica en la zona del cartílago calcificado. Estos autores relacionan el mecanismo de acúmulo y suelta del Ca por las mitocondrias con la saturación de oxígeno del tejido. La expulsión del Ca se produce por anoxia mitocondrial. Frente a ello, los estudios de Kuhlman y Mc Mamee en 1970 ( 303 ) demuestran que la zona del cartílago hipertrófico es metabólicamente muy activa, y sabemos que los osteoblastos crecen en zonas relativamente bien irrigadas, por lo que no se entiende como se produciría a su nivel la anoxia para liberar el calcio.

Baud y Badonnel ( 153 B ), 1960, observaron que en la calcifilaxis, los fibroblastos tienen un aspecto similar a los osteoblastos u osteocitos presentando en el interior de las mitocondrias gránulos densos que se depositaban en forma de roseta. Gerlach y Hörling ( 175 ) encontraron en estudios de calcifilaxis depósitos de Ca en el interior de las mitocondrias, en la proximidad de sus crestas, en forma de gránulos que crecen hasta formar bastones. Los análisis microradiográficos demostraron que se trataba de fosfato cálcico amorfo.

Bonucci (158) en 1975 estudiando el proceso de calcificación del

miocardio encuentra, como todos los autores, un depósito de Ca en las mitocondrias y en el retículo endoplásmico entre las microfibrillas. El mineral en ocasiones está en relación con un material amorfo y filamentoso que este autor considera de la familia de los mucopolisacáridos. En todos estos casos, como señala Lehninger, la mitocondria cargada de  $\text{Ca}^{++}$  conserva su morfología normal, y suponemos que los acúmulos de este ion se producen por los mecanismos previamente descritos.

Tanto los estudios de Kashiwa como los de Brighton, parecen establecer una relación entre los depósitos intracelulares de  $\text{PO}_4 \text{ Ca}$  asociados a los lípidos con los de la sustancia fundamental pericelular que dan lugar a la zona calcificada. Los primeros estudios seriados de mineralización han sido aportados por Anderson 1969 ( 148 ) y Bonucci 1966 (156-57). Para Bonucci ( 157 ) la mineralización se hace en 3 fases:

- 1ª. fase intracelular
- 2ª. paso del mineral a la sustancia fundamental
- 3ª. unión del mineral al colágeno.

Los estudios de Anderson, Bonucci, etc., demuestran la existencia de unas vesículas en la matriz cartilaginosa de las fisis, que aparecen a todos los niveles desde la zona de pequeños condrocitos hasta la zona de calcificación provisional. A nivel de los pequeños condrocitos aparecen las vesículas exentas de  $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$  el cuál las colma distalmente y se hace más abundante en la zona de calcificación provisional donde confluyen las vesículas para dar lugar a la mineralización del tejido. Las vesículas se cargan de mineral, según Anderson (148 ) por un mecanismo activo de absorción del  $\text{Ca}^{++}$ , o porque los lípidos de su interior - la fosfatidilserina- ligan el  $\text{Ca}^{++}$  que penetra en los glóbulos de calcificación gracias a la gran permeabilidad de su membrana.

Estas vesículas, que según Brighton y Hunt (235 B) tienen 0,5 a 0,5-1  $\mu$  de diámetro, son de tipo esférico y no pueden considerarse como --

prolongaciones celulares. Anderson ha demostrado que son ricas en enzimas; fosfatasa-alcalina, A.T.Pasa 5 A.M.Pasa y pirofosfatasas, pero no en fosfatasa ácida, lo que descarta su origen lisosomal. Las vesículas muestran una doble membrana con el microscopio electrónico y cuando no están calcificadas tienen un contenido osmiofílico que según Anderson sería lipídico. Los enzimas se localizan en su membrana.

Los trabajos de Bonucci y Anderson, etc., demuestran que en el cartílago las vesículas y los acúmulos de fosfato cálcico, no están en contacto directo con las fibras colágenas a las que se unen y cubren sólo en un estadio bastante más avanzado de la calcificación. Bonucci en 1967 y 1970, por diferentes procedimientos tintoriales, de decalcificación y por digestión con hialuronidasa, demuestran que los acúmulos originales del fosfato cálcico en la matriz cartilaginosa se hacen en torno a un núcleo mucopolisacárido alargado, y considera como primer paso la salida de la vesícula cargada con  $\text{PO}_4\text{Ca}$  al exterior de la célula, para localizarse en torno al núcleo polisacárido sobre el que va creciendo el cristal que se orienta después, a medida que crece, a lo largo de las fibras colágenas sobre las que se deposita. Bonucci afirma, sin poder descartar un artefacto, que los núcleos mucopolisacáridos se orientan en paralelo a la fibra colágena (20,148,152,153,157,176,177,183,186,193,199,210).

A nivel óseo conocemos la presencia de las extrusiones osteoblásticas que parecen equivaler, por su forma y caracteres tintoriales, a los glóbulos o vesículas descritos en el cartílago y en los cuales se demuestra la presencia de fosfato cálcico en forma amorfa o cristalina. Martin y cols. (22,39,50) dicen que se puede observar en algunos puntos la continuidad de las vesículas con la membrana celular de la que después se independiza, en tanto que Anderson (148) dice no haber podido encontrar dicha relación, aunque acepta el origen celular de las vesículas. Además, Cameron ha demostrado que según la orientación y la cantidad de colágeno del tejido se hace la mineralización. Cuando es un tejido laxo el fosfa



to cálcico aparece en el espacio interfibrilar y el núcleo polisacárido, -- según Bonucci, se dispone de manera suelta adaptando una forma globular, -- el mineral depositado confluye después para cubrir el colágeno. Si este -- está densamente ordenado y dispuesto en fascículos como en el hueso osteonico, los núcleos polisacáridos toman forma alargada. Tanto Cameron como Bonucci, en contra de Glimcher y Krane, afirman que aquí también tiene lugar el primer depósito mineral en los espacios interfibrilares para después colocarse dentro de las fibras, como propugnan Rasmussen y Bordier se colocarían entre las fibrillas colágenas, en el espacio que queda a lo largo del haz, en el interior del cilindro del esquema de Schmitt ( antes citado) . (18,20,45,132,148,156-58)

Estos datos parecen ser lo suficientemente verídicos como para descartar las teorías de la nucleación del fosfato cálcico por el colágeno cuyo exponente más completo son los trabajos de Glimcher y Krane, Bachra, -- (151-52,205) etc., cuyas críticas encontramos en los trabajos de Cameron, -- Howell, Irving, Bonucci, etc. (20, 177, 183 ). Una vez analizado el comienzo de la calcificación hemos de considerar el crecimiento del mineral, su control y la relación del cristal con la fibra colágena.

Existe bastante evidencia experimental de que los mucopolisacáridos tienen un papel importante en el comienzo de la calcificación. Su degradación es necesaria para el progreso de la calcificación.

La función de los mucopolisacáridos no es clara. Frente a la idea de Bonucci de que el núcleo del cristal puede ser un mucopolisacárido -- M P S --, existen una serie de trabajos, desde los de Weinstein, Sachs y Schubert (1963), que muestran que los MPS inhiben la calcificación. El condroitín y el keratan-sulfato unidos "in vitro" a una suspensión de Ca y P, impiden su precipitación y sedimentación. El condroitín sultafó "in vitro" en concentraciones de hasta 3 mM inhibe la precipitación del  $(PO_4)_2Ca_3$  como consecuencia de su estructura polianiónica que quela el Ca.

Los trabajos de Dziewiatowski 1964 (114 ) con  $S^{35}$  muestran que la presencia de mucopolisacáridos es máxima en la zona del cartílago proliferante y de los grandes condrocitos, para disminuir en la zona de calcificación provisional y en las metafisis, por tanto los mucopolisacáridos deben desaparecer antes del comienzo de la calcificación. En el área de los condrocitos hipertróficos y de la calcificación provisional, se ha demostrado la presencia de enzimas capaces de degradar estos MPS. Irwing, Baylinck, Hirschman (114,181-83) etc., analizando la metacromasia indican que el contenido de MPS ácidos va aumentando progresivamente en el cartílago de conjunción hasta la zona del cartílago hipertrófico, para disminuir bruscamente justo antes del momento de la calcificación. Los estudios de Sabet y Hawley 1971 así como los de Hirschman y Dziewiatowski con anticuerpos antimucopolisacáridos, encuentran la misma disminución brusca de los MPS antes del comienzo de la calcificación. Por último, Howell y Pita (177-178) con microanálisis por punción a diferentes niveles del cartílago de conjunción, encuentran que una concentración de MPS de 9  $\mu$ gr/ml impide totalmente el depósito de Ca y que su efecto, debido a los condroitín-sulfatos, se destruye por la hialuronidasa o por la tripsina. Por tanto, Howell concluye que se debe aceptar la existencia de una degradación enzimática de los MPS para que tenga lugar la calcificación. En 1973 señala la lisozima como responsable de la degradación enzimática de esos MPS a nivel de cartílago de conjunción.

Frente a esto y junto a los datos morfológicos de Bonucci ( 157 ), hay que considerar los datos de Bownes, Beale y de Schubert que consideran necesario para la mineralización, estabilización y unión del mineral al colágeno, la presencia de MPS y demuestran, que determinadas concentraciones de condroitín-sulfato no sólo no inhiben , sino que incluso aumentan la precipitación de  $PO_4Ca$ , teniendo en cuenta que, según Hirschman (154 ), la eliminación enzimática de los MPS impide la calcificación.

Resumiendo, parecen existir dos tipos de MPS que actúan de manera diferente; los MPS inhibidores que deben degradarse para que tenga lugar -

la calcificación; y los MPS favorecedores como los "núcleos" descritos por Bonucci.

Debemos citar por último la teoría de los pirofosfatos de Fleisch, cuyos estudios partieron de la existencia de un mecanismo de inhibición -- del depósito de fosfato cálcico y la demostración en sangre y en orina de concentraciones de pirofosfato suficientes para impedir la mineralización. El pirofosfato perdería su acción inhibidora por acción de la fosfatasa al calina. Análisis más detenidos señalan que el enlace P-O-P es preciso para su acción inhibitoria. En todas las células se producen grandes cantida - des de pirofosfatos durante el metabolismo energético, pirofosfatos que se degradan rápidamente a ortofosfatos.

Los estudios de Francis y Fleisch señalan que el pirofosfato a las concentraciones encontradas normalmente, no inhibe la mineralización sino el crecimiento del cristal, la transformación del fosfato cálcico amorfo -- en sus formas cristalinas y que esta función inhibidora se elimina por la acción de las fosfatasas. (172,173,193,201)

Se ha demostrado la presencia del pirofosfato en el hueso, en el -- cartílago y en el osteoide. Fleisch postula que forma una capa continua -- protectora sobre la superficie de los cristales que no sólo impide su cre\_ cimiento, sino además su reabsorción, y que en los puntos donde se va a de\_ positar nuevo mineral la pirofosfatasa transforma el pirofosfato en orto\_ fosfato, permitiendo a ese nivel el crecimiento óseo. En favor de esta -- teoría hay que señalar que Anderson ha demostrado en los glóbulos de calci\_ ficación la presencia de pirofosfatasa. Según Ali y Anderson ( 148 ) , los pirofosfatos son necesarios para el comienzo de la calcificación; el -- pirofosfato extracelular se degradaría por la pirofosfatasa de la membrana de las vesículas supliendo a las mismas con ortofosfato que se combinaría con el calcio en su interior, produciendo así la base del cristal de fosfa\_ to cálcico que al crecer rompería la vesícula y quedaría en el exterior -- donde seguiría creciendo.

Según el pH al que actúe la pirofosfatasa varía su efecto, en un medio alcalino favorece la precipitación de fosfato cálcico, por el contrario, en un medio ácido como a nivel del osteoclasto, su eliminación permite la -- reabsorción ósea. En favor de esta teoría están los datos de Rasmussen y Tennenhouse, que señalan que en el intestino la CT y la P.T.H. varían la con centración del pirofosfato según la concentración de  $Mg^{++}$ , de forma que la CT aumenta la cantidad de pirofosfato en tanto que la P.T.H. la disminuye y favorece la presencia de monofosfoesterasas ácidas, que pueden romper los - enlaces pirofosfatos y de esta manera favorecer la absorción del calcio.

Por último, hemos de señalar un concepto, de largo tiempo conocido, y es que los depósitos de calcio en el osteoide son un proceso que ocupan - volumen, para lo cual deben desplazar algún elemento previamente existente. Robinson (196 ) demostró que las moléculas desplazadas son las de agua, que disminuye a medida que aumenta la calcificación, de forma que el contenido en agua de los huesos totalmente calcificados es muy pequeña. Por otro la\_ do, los trabajos de Heller Steinberg demuestran que al producirse la reab\_ sorción ósea, se produce un nuevo aumento de agua en la zona ocupada previa\_ mente por el cristal. (30,47,48,196-198).

Como resumen podemos considerar:

- 1) Las células juegan un papel activo en la mineralización ósea - que está en relación con la capacidad de sus mitocondrias para acumular Ca y fosfatos cálcicos; pero sin que las mitocondrias actúen directamente a nivel de la matriz extracelular.
- 2) La existencia de unas vesículas de procedencia celular, al pa\_ recer de la membrana citoplasmática, que son el punto original

de la calcificación y presentan un contenido osmiófilo que para Bonucci es M.P.S. y para Anderson lipídico.

- 3) Según Martin y Mathews estas vesículas se cargan de fosfato cálcico en las células, de las cuales se liberan después perdiendo en el espacio extracelular su membrana. El cristal liberado confluye con los vecinos y crece, mineralizando así el tejido.

Anderson, por el contrario, afirma que por mecanismos no bien conocidos las vesículas se cargan en el espacio extracelular, primero de Ca y a continuación de  $\text{PO}_4^-$ , tras la degradación del pirofosfato. En el interior de las mismas se produce entonces el depósito de fosfato cálcico, amorfo, que por crecimiento rompe la membrana vesicular, saliendo al exterior donde confluye con los cristales vecinos para mineralizar el tejido.

- 4) Los pirofosfatos son, pues, al principio del proceso, necesarios para iniciar el depósito del fosfato cálcico, en tanto que, en fases posteriores, inhiben el crecimiento del cristal según Fleisch.
- 5) Los lípidos, en especial la fosfatidilserina, tienen un papel importante en el comienzo de la calcificación.
- 6) Los mucopolisacáridos presentan, igual que el pirofosfato, una acción doble, favorecedora e inhibidora de la calcificación.

## Mineral

Al describir la calcificación hemos visto que aparecen unas esféru las dependientes de las células que se cargan de mineral, el cuál se depo sita sobre la matriz a una cierta distancia de la célula, como describe\_ ron por primera vez Fitton Jackson y Randall ( 27,45 ) y Robinson ( 47 ). Molnar, Bonucci, Anderson, etc., ( 148,157,188 ) afirman que el mineral de\_ positado en la zona cercana a los osteoblastos lo hace con estructura -- amorfa no cristalina, en esférulas de  $9,5 \text{ \AA}$  de diámetro según Posner -- ( 193 ). A una cierta distancia, no especificada por los autores, apare\_ cen cristales que terminan por colocarse sobre la fibra colágena a la que cubren totalmente cuando se completa la calcificación.

En un principio existió una discusión bastante acentuada en torno al lugar de sedimentación de los cristales, cuya revisión encontramos en Cameron ( 20 ), quién de acuerdo con los autores más arriba señalados, -- afirma que el depósito se hace en el osteoide y cartílago, en los espacios interfibrilares de la matriz. Por el contrario, Glimcher, etc. ( 132 ) - afirma que el primer depósito se hace directamente sobre la fibra coláge\_ na. Hoy, tras la descripción de las esférulas antes mencionadas, parece fuera de duda que el primer mineral se deposita en ellas con una estructu\_ ra amorfa, y que al entrar en contacto con la fibra colágena el mineral - adopta una estructura cristalina con un cambio en el pH, que indica que - esta nueva estructura es más básica.

Fitton Jackson describe que el primer depósito se hace en forma de gránulos de unos  $100 \text{ \AA}$  de longitud, que se orientan de acuerdo a la es\_ triación de la fibra colágena, de forma que cada 4 gránulos de mineral co rresponden a una banda, y al reunirse terminan por enmascarar la fibra. - Según Robinson ( 47 ) los cristales tienen una longitud de  $400 \text{ \AA}$ , cuyo - eje mayor se coloca en paralelo a la fibra colágena adquiriendo mayor ta\_ maño los cristales que se localizan en los espacios interfibrilares, como confirman los datos de Engström ( 171 ) con estudios de microradiografía.

En torno a las dimensiones y forma de los cristales hay, así mismo, una serie de datos los cuales parecen estar en general de acuerdo en lo - que se refiere al diámetro transversal del cristal; Carlström ( 164 ) 1955, da un valor de  $220 \times 56 \text{ \AA}$ , con su eje mayor, paralelo al colágeno. Poste\_ riormente para el eje transversal da un valor entre 30 y  $70 \text{ \AA}$ , con una me\_ dia de 60, en tanto que Robinson le da una anchura de  $100 \text{ \AA}$  y Molnar -- ( 188 ) acepta un tamaño medio de 50, oscilando su anchura entre 25 y  $75 \text{ \AA}$ . Para la longitud hay más discrepancias en los datos referidos, de for\_ ma que Engström una vez acepta un valor de 200 y en otra publicación un valor de  $600 \text{ \AA}$ . Para Robinson la longitud media es de  $500 \text{ \AA}$ . Molnar - afirma que en el momento de formarse los cristales tienen una longitud de  $500 \text{ \AA}$ , al crecer forman grandes agregados que mantienen el diámetro del - cristal, aumentando su longitud a lo largo de la fibra colágena y alcan\_ zan dimensiones de 3000 y  $4000 \text{ \AA}$ . Afirma Molnar que los cristales que se aponen a continuación, sobre los primeramente formados, lo hacen con una orientación paralela a éstos. Todos los autores están de acuerdo en que el eje mayor del cristal se orienta a lo largo de la fibra colágena de - acuerdo con su periodicidad estabilizando, además, según la opinión gene\_ ral, la estructura helicoidal del colágeno que madura en contacto con el mineral. (27,47,48,164,169-171,188,196-198).

La forma del cristal es para unos autores de lámina o tábula cúbica, para otros tiene forma de prima hexagonal o de agujas.

Aunque nos ocuparemos más adelante de las formas de unión a nivel químico, es de señalar que la relación entre el cristal y la fibra coláge\_ na no está perfectamente establecida.

Cameron señala que no siempre se deposita el mineral directamente sobre la fibra, sino que lo hace entre ellas, y de acuerdo con la densi\_ dad de las fibras así se hace el depósito, adoptando en las zonas de baja densidad una forma redondeada al comienzo de la calcificación, mientras - que en las zonas muy densas el depósito se hace desde un principio en for\_

ma alargada y en relación directa con las fibras. Según él, Anderson, etc., (20,148) está perfectamente demostrado que la calcificación se hace en el osteoide sin una relación directa con el colágeno; en contra de la teoría de Glimcher y Krane ( 132) y de Rasmussen, etc., ( 45 ) quienes afirman que a nivel del hueso la mineralización se hace siempre en contacto directo con las moléculas del colágeno, como sucede en los estudios experimentales en los cuales la reunión de tropocolágeno con  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{PO}_4^-$  en solución, en las proporciones adecuadas, produce una precipitación espontánea de mineral en relación directa con la fibra colágena a la que cubre.

Glimcher, siguiendo el modelo de fibra propuesto por Petruschka y Hodge, afirma que el depósito mineral se hace en los espacios consecutivivos que aparecen a lo largo de la fibra, entre las moléculas de tropocolágeno, en la estructura en escalera, lo que no da cabida más que al 50% del mineral que se demuestra en cualquier área del hueso. Rasmussen y Bordier ( 45,139 ) corrigen este modelo adoptando el esquema de fibra colágena propuesto por Smith, afirmando que para cada 3400 Å de longitud de fibra colágena, en el interior hueco de la misma, el espacio rodeado por las 5 cadenas de tropocolágeno tiene un volumen equivalente al de cinco espacios intercadenas a lo largo de la fibra. Aceptando que el mineral se deposita también en ese espacio fibrilar central, la suma de volúmenes equivale al 90% del mineral demostrado. Con este esquema se puede explicar así mismo y según estos autores, el continuo de la estructura mi

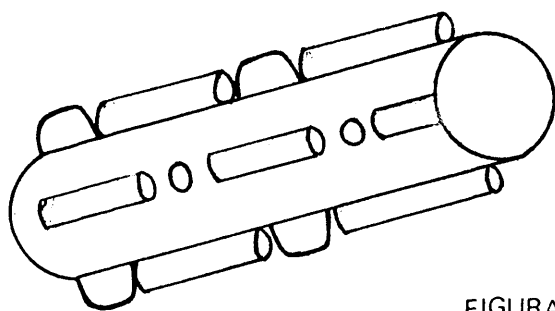
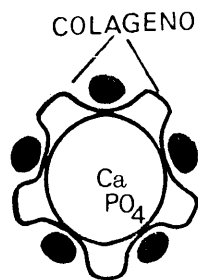


FIGURA (16)



neral y su permanencia tras la eliminación de la matriz colágena.



En apoyo de esta estructura están los estudios con desadsorción de gases del mineral óseo según Posner ( 193 ) . Y abundaría en el concepto de Kneese ( 180 ) de la "verbundbau" o armazón de la apatita por las fibras de colágeno; pero los datos analíticos directos en apoyo de esta teoría son insuficientes, y no puede aceptarse como totalmente probada.

Los análisis químicos del mineral han dado lugar a muy diversas teorías sobre su estructura y composición, hasta la demostración morfológica y química de 2 fases minerales diferentes.(151,153,165,168,171)

De Jong en 1926 inició el análisis cristalográfico del mineral, seguido de Klement, Trommel, etc., ampliándose después al estudio mediante análisis químicos microradiográficos de absorción de gases, resonancia electrónica y medidas de la difracción de la fase cristalina con rayos infrarrojos y con rayos X de diferentes ángulos de difracción.

Los componentes fundamentales de la fase mineral con  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{PO}_4^-$ ,  $\text{CO}_3^-$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , que se combinan para formar un fosfato cálcico complejo. -- Engström ( 169 ) 1956, afirmaba que la relación molar Ca/P más frecuentemente encontrada era 1,667 pudiendo variar entre 2 y 1,4 de acuerdo al tamaño del cristal y al  $\text{CO}_3^-$  incluido. Dallemagne ( 166 ) 1950, etc., en contraba por el contrario una relación Ca/P preponderante de 2,26.

En consecuencia con ello, cada uno de los autores propuso una estructura química diferente para el mineral óseo. Engström, de acuerdo -- con de Jong, etc., afirmaba que se trataba de una hidroxiapatita -OH.A.-, en tanto que Dallemagne proponía un fosfato tricálcico hidratado -PTC- . La fórmula para la primera es  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH} \cdot 2$  según Engström,  $(\text{CaOHCa}_4(\text{PO}_4)_3)_2$  para Robinson, y  $3(\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-CaOH})$  según Hendrick e Hill. Para el PTC, según Dallemagne es  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6\text{H}_2(\text{OH})_2$ , en tanto que Dixon le da una fórmula:  $3(\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$ , y Posner simplemente  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$  y el agua, incorporado, como veremos, de forma diferente al complejo. (167-71,192-93, 207).

Engström (170) dice que la OH.A derivan cristalográficamente de la flúorapatita por sustitución del radical flúor por radicales hidróxilos.

La flúorapatita como aparece naturalmente, forma cristales de estructura hexagonal dipiramidal, de fórmula  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 \text{Fl}_2$ , y el grupo es del tipo  $\text{C}_6^2\text{4}(\text{P6}_3\text{m})$ .

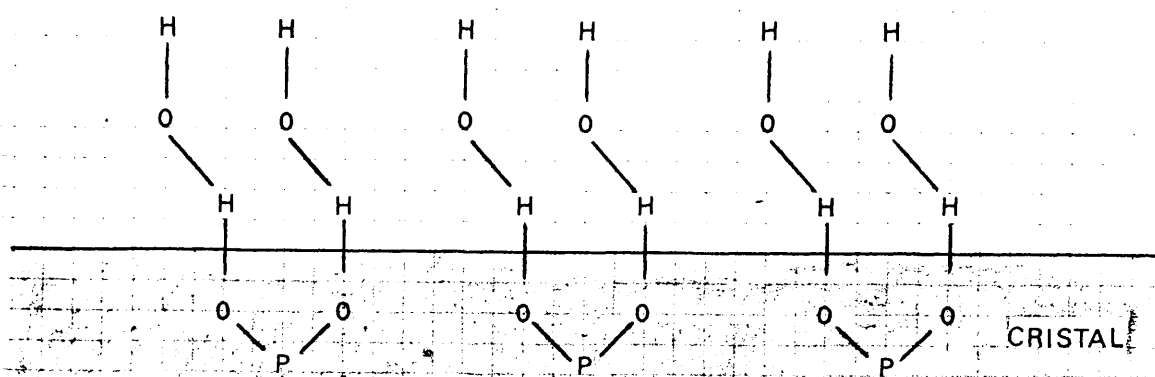
El tamaño de la célula elemental es:  $a = 9,37 \pm 0,01 \text{ \AA}$ , y  $c = 6,88 \pm 0,01 \text{ \AA}$ . Las hidroxiapatitas sintéticas o naturales, que conservan la misma estructura, pero con  $\text{OH}^-$  en lugar del Fl, tienen un tamaño ligeramente mayor, siendo las dimensiones:  $a = 9,42 \text{ \AA}$ , y  $c = 6,88 \text{ \AA}$ . Los cristales elementales en el hueso son más pequeños según opinión general de los autores, y explica que su espectro de difracción sea mucho menos definido que el de las apatitas naturales.

Desde el comienzo se observó que el espectro se hacía mucho más nítido cuando se calcinaba el mineral a  $900^\circ$ , con un acortamiento de su eje en  $0,01 \text{ \AA}$ . Para Engström, esto se debe a que el cristal pierde su exceso de agua y además crece. Por el contrario, otros autores consideran que a esa temperatura todos los fosfatos cálcicos diferentes a la OH.A cristalizan transformándose en ésta, con liberación de pirofosfato y agua. Todos los compuestos fosfocálcicos descritos son estables hasta  $1.400^\circ\text{C}$ , lo que según Brandenburger se debe a los radicales  $\text{OH}^-$ , que forman columnas perpendiculares a los triángulos formados por los átomos de  $\text{Ca}^{++}$ , que están en los vértices de los rombos del cristal, paralelos al eje cristalográfico a. y a intervalos regulares de  $3,44 \text{ \AA}$ . De los 10 átomos de  $\text{Ca}^{++}$ , 6 están en relación con los  $\text{OH}^-$  formando triángulos que rotan sucesivamente  $60^\circ$  en torno a su eje mayor para mantener la simetría. Los otros 4 átomos de  $\text{Ca}^{++}$  aparecen en columnas paralelas al eje cristalográfico c, orientados por los átomos de oxígeno de los tetraedros de  $\text{PO}_4^-$ .

Esta estructura permite, según los estudios de absorción gaseosa de Dodge (193), que entre el 10 y 12% de los átomos de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{PO}_4^-$  aparezcan en la superficie del cristal y sean asequibles a un intercambio iónico rápido, que la mayoría de las veces es isoiónico, aunque puede ser heteroiónico, y Posner (193) señala que al contrario de las resinas de intercambio iónico, se hace a la vez para aniones y cationes.

Los estudios de la energía de unión con absorción de gases que se mide por la temperatura de unión, es decir, la temperatura necesaria para romper la unión entre el cristal y otra molécula han demostrado, según Beebe (193), que las temperaturas de absorción altas son indicativas de uniones químicas con el mineral, en tanto que, las temperaturas bajas sólo indican un proceso físico de adsorción. Beebe ha demostrado que los radicales fosfatos presentan hacia la superficie del cristal sus átomos de oxígeno, que son capaces de establecer enlaces de hidrógeno con diferentes compuestos, como el metanol y el agua, sobre los cuales ejercen una acción orientadora, como vemos en el esquema núm. 18. La capacidad de unión es limitada, de forma que sobre el cristal de apatita se unen por enlaces de hidrógeno con una energía de unión elevada, dos capas de moléculas de agua, a partir de las cuales ya sólo es posible una unión por adsorción, como afirmaba Neuman.

#### ESQUEMA 18





Dallemagne (165) demostró que el lavado de los cristales de OHA con soluciones débiles de  $\text{ClH}$ , eliminaba totalmente el carbonato cálcico, lo que demuestra, según él, que el  $\text{CO}_3\text{Ca}$  está simplemente adsorbido en la superficie del cristal.

Frente a ello Carlström (171) en 1971 estudiando las apatitas carbonadas naturales, es decir, las francolitas, demostró que según la cantidad de carbonato unido a la molécula, el cuál puede oscilar entre 1,2 y el 4,2%, varía la forma y el tamaño del cristal, de forma que por cada incremento en el porcentaje de  $\text{CO}_2$  disminuye el tamaño del cristal en  $0,8 \text{ \AA}^3$ . En las francolitas, los estudios de Gruener (169) 1937, y los de Carlström y Trautz indican que el  $\text{CO}_3^-$  se incorpora a la molécula de apatita en relación con los tetraedros de ortofosfato; pero además se adsorbe en la superficie de cristal, como había demostrado Dallemagne para las apatitas óseas, en las cuales nunca se ha podido demostrar la incorporación del carbonato a la molécula de apatita.

Frente a la hidroxiapatita con  $\text{CO}_3\text{Ca}$  adsorbido en su superficie, como hemos descrito hasta ahora, Dallemagne (166) afirmaba que esa estructura no era capaz de explicar todas las peculiaridades del mineral óseo, y proponía que éste estaba formado por un PTC de fórmula  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6\text{H}_2(\text{OH})_2$ , con un espectro de difracción muy similar al de las OHA. Y señala que, frente a la fluoroapatita, el cristal óseo perdía un átomo de  $\text{Ca}^{++}$ , que era sustituido por una molécula de agua, originando así una apatita defectuosa, que es en la actualidad aceptada por gran cantidad de autores (192-93, 195, 207). En una primera teoría, 1952, pensó que el mineral era el octofosfato cálcico de Arnold, con una relación  $\text{Ca/P}$  de 1,72 y 2,5 átomos de  $\text{Ca}^{++}$  adsorbidos sobre la superficie del cristal, estructura inestable que se estabilizaba al entrar en contacto con la matriz orgánica. Posteriormente abandonó esta concepción a favor de la del fosfato tricálcico.

Dixon (167) considera que el mineral de fórmula  $3(\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$ , estaría formado por la reunión de tres moléculas de PTC y una de

hidróxido de Calcio.

Estudios posteriores han demostrado que el espectro de difracción del PTC es muy irregular, lo que sugiere que sus cristales son muy pequeños o, que más bien, se presenta en forma amorfa. Eanes (168) afirma - que el agua, que representa un 15-20% de su peso, no está adsorbida en la superficie del cristal como en la hidroxiapatita, sino que combinan - tres moléculas de agua por cada unidad de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Por el contrario, Posner (193) afirma que el agua está unida físicamente a las esférulas de PTC eliminándose a 500° C, sin modificar su estructura.

Si en un principio no se podían compaginar ambas teorías por falta de datos morfológicos y análisis cualitativos más finos, al demostrarse por un lado, con el microscopio electrónico, una variación en el aspecto del depósito mineral, y al estudiar, por otro, las variaciones de la relación Ca/P según las diferentes zonas del hueso, que con la micro radiografía mostraban diferentes grados de mineralización, y la obtención experimental de fosfatos cálcicos con relaciones Ca/P variables, -- permitió afirmar que el primer depósito mineral se hace en forma de PTC de estructura amorfa, que en contacto con el colágeno y al cabo de un -- tiempo se transforma en hidroxiapatita, lo que no hace nunca totalmente, ya que, en el esqueleto adulto hasta un 30% del mineral permanece en forma amorfa.

Si ya Engström, etc., habían demostrado microradiográficamente -- que había en la cortical áreas de mineralización diferente, los primeros estudios con isótopos radioactivos de Amprino, parecieron indicar que -- las áreas de menor mineralización eran las más ávidas por el  $\text{Ca}^{++}$ ; pero los estudios posteriores de Rowland (200), con- $\text{Ca}^{45}$  y análisis seriados muy precoces, demostraron que el intercambio iónico más intenso sucedía en las áreas de mayor mineralización, que por otro lado son las más próximas a las superficies de intercambio, es decir, endostal, periosteal y canales de Havers.

Hendrick y Hendrick e Hill señalaron que una parte de los átomos de  $\text{Ca}^{++}$  del mineral óseo no aparecía en forma cristalina, sino amorfa y que ésta era, en sus estudios isotópicos, más susceptible de intercambio iónico que la porción cristalina.

Los estudios de la relación Ca/P en el hueso, de Dallemagne y Fa-bry (1956), mostraban una variación entre 2,26 y 1,14, siendo la más frecuentemente encontrada la primera. Posner y Dallemagne (1938) obtuvieron de manera sintética una serie de relaciones Ca/P variable en sus fosfatos cálcicos:

1. el octofosfato cálcico de Arnold con una relación 1,72
2. un fosfato tricálcico con relación Ca/P de 1,94, es decir, - una molécula con 9 átomos de  $\text{Ca}^{++}$  y 6 radicales  $\text{PO}_4^-$
3. una hidroxiapatita con 10 átomos de  $\text{Ca}^{++}$  y 6 radicales fosfóricos, con una relación Ca/P 2,14, que se puede hacer más estable adquiriendo una relación 2,26 por un aumento del Ca que sustituye en parte a un átomo de hidrógeno, quedando -- 10,5 átomos de Ca para 6 de  $\text{PO}_4^-$ .

Hodge y Klement (1968) consideran que el mineral óseo es una hidroxiapatita con  $\text{Ca}^{++}$  o  $\text{PO}_4^-$  en exceso unidos a la superficie del cristal, lo que explicaría sus relaciones variables. Para Dixon y Perkins (1967) la hidroxiapatita tiene una relación Ca/P de 2,14 y la diferencia hasta 1,94 típica de PTC hidratado, según ellos se debe a la presencia de radicales fosfato adsorbidos en la superficie del cristal.

Los análisis de la relación Ca/P, en diferentes especies animales de Biltz y Pellegrino (1955) muestran que la relación es cambiante y varía entre 1,67 y 1,89 con un valor medio de 1,73 en análisis globales del esqueleto.

Richelle ( 195) mediante métodos gravimétricos analiza la relación de la matriz orgánica y el contenido mineral en diferentes áreas óseas, en contrando que las áreas muy mineralizadas tienen una relación de 2,8 en - contra del valor 2,11 que aparece normalmente tras calcinar el mineral a - 900° y en las zonas de baja mineralización la relación desciende a 1,95. - Richelle afirma que el mineral depositado es un fosfato tricálcico que se une a través de sus radicales fosfóricos al colágeno.

Los análisis de Urist y Dowell (208-9) del hueso en crecimiento -- muestran a nivel de la diáfisis una relación Ca/P de  $1,6^{+0,1}$ . A nivel del cartílago calcificado la relación es de 1,48 a 1,50, en la esponjosa prima\_ria de 1,50 y la secundaria oscila entre 1,57 y 1,60. Los diferentes mine\_rales así obtenidos liberan pirofosfato y agua al calcinarse, el primero - en una cantidad hasta del 2,5% del mineral depositado. A nivel de las diá\_fisis encuentran un aumento de la relación Ca/P hasta de 1,67 con el paso del tiempo. La porción mineral que presenta esta relación tiene una cris\_talinidad mejor, según muestran los análisis espectrográficos, y liberan -- con el calor una cantidad mucho menor de pirofosfato.

Urist, basándose también en datos experimentales de precipitación - de fosfatos cálcicos de proporcionalidad diferente, dice que la fase mine\_ral está formada por hidroxiapatita con una relación de 1,67 que se mezcla con otro compuesto cálcico diferente al PTC, ya que, a nivel del cartílago calcificado la relación encontrada es de 1,48, inferior al 1,50 de los fos\_fatos tricálcicos. Por ello postula la presencia de un fosfato dicálcico hidratado, que se adsorbe sobre la superficie del cristal de apatita en - una proporción de hasta el 50% y explicaría las variaciones en la relación Ca/P descrita. Este fosfato dicálcico con la maduración del mineral se in\_corpora al cristal de hidroxiapatita, que se acerca así al compuesto natu\_ral. Para Urist la aparición del fosfato dicálcico está en relación con - una matriz orgánica ácida, en especial MPS ácidos, como los del cartílago.

Frente a la concepción de Urist, Eanes, Posner y Termine ( 168,207 )



afirman que el mineral se deposita en una primera fase en forma de fosfato tricálcico, como esférulas de  $9,5 \text{ \AA}$  de diámetro, con una relación Ca/P de 1,50 y de fórmula  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$  que, en contacto con la fibra colágena y por un proceso de maduración se transformaría en una hidroxiapatita de fórmula  $(\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH})_2$ , con carbonato cálcico adsorbido en la superficie del -- cristal y con una relación Ca/P de 1,67. Incluso en los tejidos óseos -- adultos coexisten ambos compuestos, ya que, la relación más frecuentemente encontrada es la de 1,57, que representaría la suma de la OH.A de relación 1,67 con el PTC de relación 1,50. El PTC puede constituir en el adulto -- hasta el 30% de todo el mineral. A su nivel, se efectuaría el intercambio iónico de forma preponderante al ser un compuesto metabólicamente más activo.

La falta de cristalización completa y el crecimiento limitado de -- los cristales se debe a la presencia en la matriz de una serie de factores no bien conocidos. El  $\text{Mg}^{++}$  "in vitro" impide la transformación del PTC en OH.A, pero su concentración en los tejidos es insuficiente. Los polianio\_ nes y el radical  $\text{CO}_3^-$  tienen la misma función y los pirofosfatos, de acuer\_ do con Fleisch y Posner, son los elementos principales en la inhibición -- del crecimiento cristalino, como ya dijimos al hablar de la calcificación.

## E L C A L L O D E F R A C T U R A

Hemorragia

Inflamación

Hematoma

El callo periostal

Callo medular

Vascularización

Cartílago

Factores mecánicos

## EL CALLO DE FRACTURA

Después de estudiar los diferentes componentes aislados del hueso, vamos a ver ahora como se modifican tras la fractura y el proceso reparador de la misma: los fenómenos celulares y vasculares que lo determinan y que nos llevarán a discutir dos factores muy importantes, que son, por un lado el origen de las células que dan lugar al callo, es decir, periostio endostio, cavidad medular, canales de Havers y tejido perivascular; y por otro lado los estímulos que desencadenan esta proliferación celular. Hay que analizar por último las modificaciones que tienen lugar en la evolución del callo de fractura tras cambiar las condiciones mecánicas que lo determinan. Al margen de los estudios ya históricos cuya revisión hasta 1918 encontramos en Keith ( 297 ), se han usado una serie de modelos experimentales para estudiar la respuesta a la fractura y su proceso de curación. De un lado roedores como el conejo y la rata, en los cuales la consolidación es la regla y donde el hueso cortical adulto no muestra un desarrollo del sistema osteónico tan elevado como el que aparece en el esqueleto humano. A éste se acerca más el hueso del perro, que es el otro animal de experimentación empleado en el estudio del callo de fractura. - Se han realizado también estudios en el hombre mediante radiografías, isótopos y estudio histológico de los fragmentos de callo obtenidos de autopsias y durante los actos quirúrgicos de osteosíntesis, como recoge -- principalmente Aegerter ( 14 ) .

En una primera fase vamos a considerar el callo de fractura según aparece en la diáfisis de los huesos largos de animales de experimentación en los que la fractura no se inmoviliza o se hace sólo con yeso. Existen gran cantidad de estudios realizados en costillas que tampoco están sometidas a ningún tipo de contención rígida, y cuya imagen histológica es bastante similar a las que se obtienen en las diáfisis de los huesos largos en las condiciones señaladas. El callo esponjoso no nos interesa para el estudio que hemos realizado.

El primer problema con el que nos encontramos, como ya señalaba Ham - (277) en 1930, es el de la nomenclatura de los elementos celulares que aparecen en este proceso, por su colocación espacial en el callo y el origen que se les atribuye.

### Hemorragia .-

Como consecuencia de la fractura hay una pérdida de continuidad de todos los elementos óseos: el periostio aparece roto y se separa en mayor o menor extensión de la cortical. Fragmentación de la misma, que sólo en los casos producidos quirúrgicamente presenta un trazo limpio, en los demás aparece astillada con esquirlas sueltas; por tanto en cualquier tipo de fractura, incluso en las que macroscópicamente aparecen nítidas, existen siempre pequeños fragmentos óseos en el espacio fracturario que quedan aislados y, como - señala Coutelier (246), toda fractura al menos desde el punto de vista microscópico, es siempre multifragmentaria.

Se produce, además, una interrupción del cilindro medular y en consecuencia una hemorragia intensa por rotura de los vasos, así como una necrosis celular más o menos extendida. La hemorragia aparece en las partes blandas que circundan al hueso por la acción mecánica que dislacera las mismas y por la lesión que origina el desplazamiento de los fragmentos óseos. La rotura del periostio permite el paso del hematoma medular a las zonas circundantes, apareciendo en áreas determinadas como se conoce en la clínica desde la era preradiológica.

El periostio en su capa externa presenta abundantes vasos que se rompen y que contribuyen además a la hemorragia. La tercera fuente de hemorragia son los capilares de los canales de Havers. Su rotura determina, al ocluirse por los procesos de coagulación normales, el cierre de los capilares rotos y la aparición en la cortical de zonas exentas de todo aporte nutricional,

con necrosis de los osteocitos subsidiarios de los vasos rotos que topográficamente corresponden a los extremos fracturarios.

La lesión de la cavidad medular conduce a una hemorragia más abundante por la lesión de los lagos venosos y la interrupción de la arteria nutricia, que contribuye grandemente a la isquemia de las corticales, pues los dos tercios internos de las mismas están nutridos por ella, en tanto que el tercio externo lo hace a partir de los vasos periostales.

La hemorragia se coagula rápidamente y este coágulo se extiende desde la periferia del hematoma hacia el centro, dando lugar a la aparición de una malla de fibrina en la que quedan atrapados los elementos formes cuya morfología comienza a alterarse pronto y cuyos cambios son claramente visibles a partir del tercer día. El coágulo de fibrina perdura hasta fases muy avanzadas del proceso reparador. (14, 34, 216, 258, 325, 393)

Como consecuencia de la lesión vascular se producen: a) un ésta - sis sanguíneo con vasodilatación, transudación y edema; b) una disminu - ción del riego con necrosis y aumento de los productos de degradación celular que condiciona el aumento de la presión osmótica y de la presión oncótica local; se favorece así la aparición del edema y de un estado de acido - sis local.

La acidosis junto al acúmulo de los productos de degradación de la glucólisis anaerobia, en especial el ácido láctico, condicionan una mayor reabsorción de las sales cálcicas de los extremos fracturarios. Habrá, -- pues, en toda fractura una osteolisis química por las condiciones locales, lo cual explica por un lado la reabsorción de los extremos fracturarios y, por otro, la de los pequeños fragmentos óseos microscópicos que habíamos descrito aparecen siempre a nivel del trazo de fractura. Esta osteolisis, según del Torto y Coutelier (393), se produce aparentemente sin la inter - vención de elementos celulares.

A nivel del foco de fractura hay una sobresaturación de fosfatos y

de calcio que se solubilizan por el medio ácido en el que se encuentran y que impide su precipitación.

Los trastornos vasculares locales en las primeras fases no permiten su total reabsorción y aparece de esta manera lo que Leriche y Policard ( 315 ) en 1926 denominaron la sobrecarga cálcica local, que en la actualidad recibe un significado distinto del que le dieron los autores mencionados, los cuales atribuían a esta sobrecarga local de calcio la presencia del mineral necesario para la osificación del callo, como fenómeno puramente local, ya que, entonces se consideraba la mineralización como un proceso químico puro, sin influjo alguno de las células. Por otro lado, como ya señalaremos, hay una osteopenia global del hueso afecto que aparece también, aunque en grado mínimo, a nivel de los demás huesos de la economía ( 230,242,407 ).

La acidosis según del Torto ( 393 ) se mantiene hasta el décimo día, a partir del cual el pH gira hacia la normalidad e incluso hacia la alcalinidad, nivel en el cual se mantiene durante cierto tiempo. Tiempo en el que se producen los fenómenos de osificación. A este respecto hay que señalar que Murray ( 278 ) atribuye, como del Torto, etc., la acidosis al catabolismo celular, mientras que Kelly ( 313 ) la equipara a la acidosis que aparece en la sangre conservada para transfusiones al hacerse anaerobio el metabolismo de sus hematies. Wray ( 408-9 ) aspirando el hematoma en 1967 demostró una acidosis local, pero Kelly ( 313 ) en 1969 no encuentra alteraciones apreciables del pH en la sangre circulante del hueso fracturado. La contradicción se explica al ser dos medidas diferentes. Un autor mide local y directamente el pH del hematoma, en tanto que el otro mide las alteraciones del pH de la sangra que fluye hacia y desde el callo de fractura.

El hematoma no es más que una consecuencia de la fractura. Lo que nos interesa conocer es la respuesta de los elementos celulares vivos frente a la lesión producida, así como las diferentes interpretaciones --

que se han dado de la misma. Por un lado hay que considerar los fenómenos que se producen en torno al hematoma y que llevarán a su desaparición, y - por otro lado los procesos que darán lugar al callo de fractura propiamente dicho. Procesos que en una primera fase al menos, según podemos colegir de los estudios de la literatura, pueden aparecer diferentes, aunque - después ambos confluyan en la reparación ósea.

Existe la posibilidad de considerar el callo como un proceso inflamatorio más, con la peculiaridad de localizarse a nivel del hueso y tener un origen mecánico, así como terminar el proceso reparador con la osificación de la cicatriz. (216,228,237,246,260,268,310)

El hueso tiene una capacidad de respuesta limitada frente al medio, que se restringe a la formación y a la destrucción ósea, que pueden dar - respuestas aparentemente dispares al alterar su organización y secuencia - en el espacio y en el tiempo.

### Inflamación .-

La idea de considerar el callo como un proceso inflamatorio no es - nueva. Ya Dieterich, en 1925, al contrario que Kraft, considera al callo como un proceso inflamatorio igual que Asada, Kuentscher, etc. (211,258).

Para poder tomarlo así, hemos de ver antes cuales son las características particulares de un proceso inflamatorio y si estas características pueden trasladarse a los fenómenos que encontramos en el desarrollo -- del callo, teniendo en cuenta que la mayor parte de los estudios sobre la inflamación se han realizado en tejidos blandos y usándose como base las - respuestas inmunitarias y antibacterianas. Lubarsch (321) considera la existencia de una regeneración inflamatoria entre los procesos puramente re - generativos y los puramente inflamatorios, lo que sería para muchos autores

el callo, es decir, un fenómeno a caballo entre la inflamación y la regeneración tisular.

Es de señalar que Delarue, 1955, dice que la inflamación es la base de toda regeneración o cicatrización tisular y que si en el animal infe - rior, como hace Becker (422 ), es posible separar claramente la regeneración de la cicatrización, en el animal superior, en especial en el hombre, la regeneración está limitada a nivel tisular y da lugar a lo que se conoce como cicatrización, cuya base es siempre un proceso inflamatorio. Llega a afirmar incluso que sin reacción inflamatoria no hay cicatrización, y que los fenómenos proliferativos son muy precoces y aparecen ya durante la fase exudativa. (241)

Lubarsch, etc., postula que sólo se debe hablar de proceso inflamatorio si se combinan las tres características siguientes:

- 1º su naturaleza alterativa
- 2º un proceso exudativo-infiltrativo
- 3º un proceso proliferativo.

La inflamación ha de comenzar siempre por la fase alterativa, que - podría considerarse como su primer paso o bien ser la causa desencadenante de los dos procesos siguientes, en el sentido de que la alteración de los elementos tisulares, por el agente causal que sea, determina el desencadenamiento de toda la reacción. Lubarsch toma siempre la inflamación como - un proceso de defensa del organismo e incluye en alteración los procesos - reactivos que aparecen a nivel de las células del parénquima y estromas lesionados, señalando que, cuando la reacción es intensa, se producen así -- mismo alteraciones en la sustancia fundamental. Para Ham (29 ) hay en - la inflamación un proceso de lisis, un proceso de reacción y un proceso de reparación.

Se incluyen para Lubarsch en la fase alterativa las modificaciones



tintoriales que aparecen en las células, tanto en sentido productivo para la síntesis de las proteínas, como es una mayor basofilia, un aumento del núcleo, etc., y las que aparecen por degeneración y necrosis celular, así como las modificaciones de la sustancia fundamental por el edema, etc.

El segundo fenómeno que tiene lugar, y para muchos autores el primer paso de la inflamación, es el proceso exudativo infiltrativo, que es realmente un fenómeno vascular. Hay en primer lugar una hiperemia que al comienzo es una hiperemia activa por dilatación vascular con aumento de la velocidad de la circulación, como afirma Lubarsch. Ricker pensaba que era debido a un influjo nervioso. En la actualidad se da mayor valor a los factores tóxicos locales. Si en una primera fase la hiperemia es activa, posteriormente se produce un éstasis con enlentecimiento de la circulación. Este enlentecimiento determina, según Sánchez Lucas, por la presencia del embarramiento de los hematies, la marginación de los leucocitos hacia la pared capilar que atraviesan, como ya describió Gonheim, -- constituyendo la diapedesis. Para Ham el que los leucocitos queden unidos a la pared capilar se debería además a una alteración de la superficie endotelial por las sustancias tóxicas locales, que ejercen un efecto de atracción sobre los leucocitos, determinando así su diapedesis.

Los elementos formes que emigran en primer lugar son los granulocitos, sustituidos en fases más avanzadas por monocitos que, como sabemos, son células circulantes del sistema retículo endotelial S.R.E. y que pueden mostrar formas de transición con los grandes linfocitos. Al pasar -- los monocitos circulantes a los tejidos se transforman en macrófagos. Los linfocitos emigran también y tienen mayor interés en las inflamaciones crónicas infecciosas y de origen inmune.

No hay sólo diapedesis, sino que el éstasis vascular, las alteraciones de las paredes endoteliales por las noxas tisulares, la acidosis y la hipoxia relativa, producen una plasmaferesis con paso de líquidos y -- proteínas a los tejidos, entre las proteínas debemos considerar el fibri

nógeno que se activa, depositándose en mallas de fibrina. Esta mayor permeabilidad se ha demostrado con el empleo de colorantes que no atraviesan las paredes capilares normales y que aparecen en los focos de inflamación.

Antes de considerar el tercer fenómeno de la inflamación tenemos - que hacer una relación de los mediadores químicos de esta respuesta, lo - que nos podría dar alguna luz sobre las teorías de los supuestos mediadores químicos específicos del callo, como la osteogenina de Lacroix (311) , y los procesos de inducción ósea.

Según Austen (217) las alteraciones microvasculares son la consecuencia de la activación de unos sistemas mediadores que actúan directamente sobre la pared vascular a través de sustancias químicas o por atracción y/o alteración de diferentes elementos celulares. En el primer grupo hay que considerar como los más importantes el complemento, las quininas y las alteraciones en el sistema de la coagulación. En el segundo grupo se incluyen los productos que están en relación con la alergia y los segregados por las células cebadas.

El complemento es el conjunto de nueve proteínas séricas que se activan secuencialmente e intervienen en los procesos de reacción de antígeno-anticuerpo. En el sistema completo la secuencia es  $C_1-C_4-C_2-C_3-C_5-C_6-C_7-C_8-C_9$ . Hemos de señalar que el paso  $C_2$  a  $C_3$  libera una quinina  $C$  y que la activación del  $C_3$  libera una anafilaxotoxina que produce una estimulación de la fagocitosis. El paso  $C_6$  a  $C_7$  libera factores quimiotáxicos igual -- que el  $C_5$ . El factor  $C_8$  es el primero en producir alteraciones de la membrana celular, que se completan por las acciones de  $C_9$  que determinan la aparición de fenómenos de lisis celular. Es de señalar que este sistema se puede iniciar en el centro de la cadena y que se puede desarrollar saltando alguna de sus fases. Por último este sistema, cuya descripción completa se - sale de nuestro campo, está sometido a diversos influjos inhibidores y excitadores y presenta un mecanismo de autorregulación igual que otros muchos sistemas biológicos. Los trabajos de Perlman (217) indican que intervien

ne así mismo en procesos en los que los linfocitos juegan un papel importante. Se han descrito alteraciones del sistema complemento en las artritis - reumatoides.

Más importancia, en principio, parece tener para nosotros el sistema de las quininas y su relación con los mecanismos de coagulación. En 1930 Kraut y col. produjeron cuadros de hipotensión por la inoculación experimental de un extracto pancreático que liberaría calidina a partir de una  $\alpha$  glo bulina plasmática. La calidina es un deca péptico del cual Rocha y Silva ob tuvieron otros derivado no peptídico denominado calicreína. Se han encontra do posteriormente una serie de sustancias que se conocen globalmente como - quininas plasmáticas. La alfa globulina de la cual derivan se conoce como - quininógeno.

Se ha demostrado una relación causal entre el factor Hageman o fac - tor contacto y las quininas, de manera que el factor Hageman, la plasmina y un factor que se conoce como factor permeabilizante diluido, actúan en for - ma secuencial para transformar el quininógeno en calicreína. De estos fac - tores, según Kaplan (217) el más importante es un fragmento del factor Hage man que tiene un PM de aproximadamente 35.000.

Al parecer, los factores que estimulan al factor contacto, y por tan to la coagulación, activarían también la producción de calicreína. Para -- que suceda así tendría que intervenir, además, el sistema fibrinolítico ac tivando la plasmina que a su vez estimula el complemento. Por otro lado la calicreína forma bradiquinina que es un quimiotáxico directo de los neutró - filos.

Junto a estos sistemas hormonales existen unos sistemas tisulares en tre los cuales hemos de citar la histamina, que como sabemos está en rela - ción con la presencia de células cebadas, demostradas perfectamente a nivel del callo de fractura por Partsch y Billich y Lindholm y cols. (318B,349).



La histamina tiene una acción permeabilizadora del endotelio por desconexión parcial de sus células según Majno. El enzima degradante de la histamina, la histamina decarboxilasa, aparece en concentraciones muy elevadas en los tejidos de granulación jóvenes. Hay otra serie de factores locales como la serotonina, etc., no bien definidos y en cuya descripción no vamos a entrar. Por último, hay que señalar que los leucocitos liberan en sus lisis enzimas lisosómicos que contribuyen a la destrucción tisular.

La tercera fase de la inflamación es la productiva. En ella encontramos :

- 1º un acúmulo celular por emigración de las formas sanguíneas por diapedesis a través de la pared capilar
- 2º una liberación y proliferación de los elementos móviles de los tejidos : histiocitos, macrófagos, así como una neoformación conjuntiva.

Según Lubarsch la fase proliferativa es tan importante que hace en ocasiones pasar desapercibidas las otras fases, por lo que algunos autores niegan su existencia. Sánchez Lucas considera por un lado las formas puramente celulares y por otro las formas granulomatosas, caracterizadas por su rica vascularización, que determinarán la fase reparadora de la inflamación. Lubarsch distingue por fin lo que él llama la neoformación inflamatoria de los tejidos, es decir, aquellas manifestaciones celulares que aparecen en el curso de una inflamación y que conducirán a la sustitución de las partes destruidas y al cierre de las soluciones de continuidad. Este proceso estaría a caballo entre las inflamaciones puras y la regeneración tisular sin cuadro inflamatorio, lo que denomina la curación primaria. Considera como ejemplo típico de neoformación inflamatoria los tejidos de granulación antes señalados, que están integrados por capilares, células mononucleadas redondas, células polimorfas y macrófagos. Los vasos se forman por gemación lateral de vasos previos, yemas en torno a las cuales aparecen células re

dondas, pequeñas, asimilables a linfocitos y a fibroblastos jóvenes. Aparecen también células multinucleadas encargadas de la reabsorción de los detritus tisulares. Todos estos elementos se disponen en torno al vaso, cuyo trayecto determinará la estructura del tejido.

Los fibroblastos producen un armazón colágeno que contribuye al sos -  
tén de dicha estructura y que en un principio toma una disposición laxa.

Tras este breve esquema de la inflamación volvamos ahora a analizar -  
lo que tiene lugar a nivel del hueso para dar lugar a la aparición del callo  
de fractura, señalando de antemano que la proliferación celular, así como --  
los brotes vasculares, dominan claramente el cuadro.

#### Hematoma. -

Este se esparce, como ya señalábamos, hacia las partes blandas veci -  
nas a las que infiltra más o menos, ya que, la capa limitante de periosteo -  
se ha roto; por otro lado, el hematoma invade en una extensión mayor o menor  
el canal medular.

A nivel de las partes blandas, y en ocasiones bien diferenciable de -  
la reacción periostal, se produce un infiltrado de granulocitos que se trans  
forma rápidamente en un infiltrado formado por dos tipos de células: unas pe  
queñas, redondas, de núcleo grande y otras mayores, alargadas, polimorfas. -  
Aparecen abundantes capilares en torno a los cuales hay una mayor densidad -  
celular.

Para Ham, y Ham y Harris, el hematoma es inútil e incluso a sus ojos  
es perjudicial. Según ellos el hematoma es una barrera para la prolifera -  
ción del callo, interpretan el acúmulo de células y vasos en su entorno co -

mo una dificultad de estas estructuras para la invasión del hematoma, que - desaparece por compresión no sirviendo de base al tejido de granulación. - A nivel de la médular, por el contrario, es invadido por la reacción celular al ser el único camino que encuentra ésta para extenderse. A este punto de vista se unen en cierto modo Partsch y Billich (278,349) que diferencian el comportamiento celular a nivel de la medular, donde afirman que es la necrosis de la medular en sí, y no el hematoma, la responsable de la formación - de una barrera celular de macrófagos y de células cebadas hiperplásicas, -- que interpretan como elementos fagocitarios de los productos de degradación del tejido medular. Estas células se originarían a partir del S.R.E. de la médula ósea sana, así como de células circulantes.

A nivel del periosteo y de las partes blandas, consideran que el hematoma es también una barrera para el desarrollo del callo, y se elimina por fagocitos móviles. Las células cebadas jugarían aquí un papel muy inferior al que representan a nivel de la medular.

Dieterich (258 ) considera que el hematoma es reabsorbido por un proceso inflamatorio sin ningún carácter especial, con infiltración celular, - proliferación de histiocitos y vasos.

Según del Torto ( 393) a partir de las 72 horas hay una mononucleosis en torno al hematoma cuya destrucción se hace franca a partir del cuarto día. Junto a los elementos macrofágicos aparecen elementos fibroblásticos polimorfos que se conexionan entre sí e invaden el hematoma a medida -- que éste degenera, haciendo la invasión de manera concéntrica. Este proceso es lento y, en el animal de experimentación, la penetración del hematoma continúa hasta el 20 día postfractura; fenómeno que Leriche y Policard denominaron colonización conectiva del callo, colonización que se hace a partir de un tejido de granulación que procede de todos los puntos circundantes, - es decir, de las partes blandas del periostio de los canales de Havers, y - de la medular. (315).

Los estudios con el microscopio electrónico de Prasard (356-7) indican que los mononucleares contienen una gran cantidad de lisosomas que se abren en la célula produciendo una vacuolización del citoplasma con rotura celular y liberación de los enzimas lisosómicos al exterior, contribuyendo así a la degradación de los detritus hemáticos. Rokanen (384-85) encuentra experimentalmente, que los anticoagulantes producen un retardo de consolidación de los callos que tienen más cartílago y son más voluminosos que los controles, debido a un mayor desprendimiento periosteal por la hemorragia fomentada por los anticoagulantes.

Zuckman (411-13) en 1966 también aboga en la idea de la colonización conectiva del hematoma y, aunque no se apunta ni a favor ni en contra del papel activo del hematoma, señala que según la extensión de éste, así será -- después el volumen del callo.

Aegerter ( 14 ) da también un papel muy importante al hematoma señalando que ya a las 6 horas hay una penetración del mismo por fibroblastos y que el tejido de granulación invasor puede incluso hacer una osificación -- desmoide directa por su riqueza en vasos. A pesar de lo cuál, la reabsorción completa del coágulo es muy lenta.

Judet y Judet (291 ) en 1960 sigue a Leriche al aceptar que el hematoma sufre una reabsorción inflamatoria, con invasión por un tejido de granulación originado en las inmediaciones.

Geist, Spencer, Herndon y Chase ( 272,280 ) aspirando de forma intermitente el hematoma en defectos diafisarios corticales del perro, no encuentran un efecto positivo o negativo del mismo sobre la evolución del callo.

En relación al papel de la fibrina en este proceso, del Torto dice -- que su red se refuerza por una precipitación posterior de albúmina y sirve de base a la invasión vascular y celular, lo que niega Ham.

Knoefler ( 34 ) 1967, da a la fibrina un papel muy importante señalando que su depósito no se va a hacer al azar sino que responde a la existencia de líneas de fuerza en la zona donde tiene lugar la misma, según los desplazamientos sufridos por los fragmentos que determinarán las tensiones locales. Los trabajos "in vitro" de este autor y de Weiss, demuestran que la fibrina se polimeriza de acuerdo con las tensiones a las que está sometida y se orienta con el eje mayor de su molécula paralelo a las líneas de tensión, de forma que si los fragmentos permanecen alineados, la fibrina se deposita en paralelo a su alrededor y cuando se angulan, la fibrina se deposita más en la zona cóncava siguiendo las líneas de fuerza, lo que se visualiza bien con la luz polarizada. Parece que en este proceso, al menos "in vitro", intervienen además las fuerzas de tensión superficial, ya que, el depósito de la fibrina es un fenómeno que se desarrolla en superficie. "In vitro", la orientación de la fibrina sería más complicada porque los momentos mecánicos son más complejos. En las zonas de contacto entre los fragmentos, la compresión ejercida por las fuerzas musculares hace tomar a la fibrina una disposición perpendicular a las fuerzas locales de compresión. Se deposita más intensamente en las zonas cóncavas en los casos en el que existe una angulación de los fragmentos. Knoefler considera que al menos "in vivo" la existencia de un exceso de fibrina puede ser perjudicial para el desarrollo celular.

Los fibroblastos que invaden las redes de fibrina "in vivo" lo hacen siguiendo la disposición de las micelas proteicas. Al tomar agua del medio para su metabolismo, determinan una retracción aún mayor de la red de fibrina aumentando así las líneas de fuerza orientadoras de las células, que -- muestran en las zonas libres de tensión una forma estrellada polimorfa que -- se transforma en fusiforme en las zonas de tensión, y se hacen esféricas en las zonas sometidas a compresión. (220).

Por último, hay que señalar los datos de Moscona, quién indica que se forman vías de penetración celular en el hematoma, ya que, las primeras células que entran segregan MPS que sirven de información química a las células siguientes.



Coutelier (246) en 1969 también se apunta a la idea que el hematoma es invadido por la respuesta proliferativa celular, pero no sólo la de tipo fibroblástico, sino también por masas cartilaginosas.

Si estos son los puntos de vista sobre hematoma como barrera o sustrato anatómico de la invasión celular, no terminan ahí las discusiones en torno a su función, ya que para algunos autores jugaría un papel inductor de la osteogénesis. Papel postulado por primera vez por Bier (228) en 1917, quién afirma la producción en el hematoma de una sustancia de acción hormonal local, responsable del desencadenamiento de la respuesta celular; pero los intentos repetidos de inyectar extractos del hematoma en otros puntos de la economía para producir una inducción ósea, no han tenido resultado positivo en ninguna ocasión. (281)

Pasamos ahora al estudio de la respuesta proliferativa celular que da lugar al callo propiamente dicho. Desde antiguo se conoce que hay una porción externa del mismo en relación con el periostio y que desde los estudios de Ollier se considera como la parte principal del callo. Por otro lado hemos de considerar el callo central o medular. Ambos en las fracturas con desplazamiento se reúnen para dar lugar al callo definitivo y a la consolidación ósea. La influencia de las corticales en el proceso de reparación se ha considerado clásicamente como secundario y su contribución era valorada de manera distinta según los autores.

#### El callo periostal .-

La vitola circunferencial externa de Duhamel se consideró como el factor principal del callo. (240,245,252,288,289,325-8,406).

El periostio, como ya hemos señalado, aparece de manera diferente en

el animal en crecimiento y en el animal adulto. Mientras perdura el crecimiento se diferencian claramente dos zonas, una externa fibrosa, densa con celularidad escasa y fibroblastos adultos dispuestos en paralelo a la cortical. Es una capa rica en vasos. La capa interna es, por el contrario, rica en células, escasa en fibras laxas y con una proporción menor de vasos. Las células que están en contacto directo con el hueso presentan la morfología típica del osteoblasto, y en ella han visto los autores, desde Ollier, el origen del crecimiento aposicional del hueso.

En el adulto cambia su aspecto, la capa externa se mantiene igual, pero la capa interna "el cambium" como la denominara Billroth, es difícilmente definible. La capa de células que cubren la superficie ósea han perdido su aspecto osteoblástico típico. Estas adoptan una forma aplanada fusiforme y forman un estrato aparentemente discontinuo, según describieran Bruns, Dieterich, Asada, Ham ( 216,222,228,258,326 ), etc..

En los estudios clásicos, la capa interna cambial no ha sido aceptada por muchos autores como parte integrante del periostio. Bier (228) Martin (326) y toda esa escuela no daban al periostio un papel osteoformador y consideraban que las células que aparecían sobre la superficie ósea se debía a artefactos, localizándose en los puntos de penetración de los vasos en la cortical, al ser elementos celulares acompañantes de los mismos.

Las discusiones clásicas sobre la contribución del periostio a la osteogénesis la podemos dividir en autores que están a favor de su papel preponderante o no, y entre los que no le dan valor en absoluto y los que le dan un papel secundario. Dichos autores emplearon para su estudio las técnicas experimentales de trasplante periostal, o la producción de defectos corticales, dejando el periostio o la medular "in situ", a partir de los cuales debía producirse la regeneración ósea.

Como hemos señalado, Ollier, Bruns, Kraft, Axhausen, consideraban al periostio fundamental para la neoformación ósea reparadora. Surge la discusión al considerar su reactividad en el animal adulto; Billroth describió -

la capa interna cambial compuesta por células con capacidad osteoblástica en el animal joven, pero en el adulto su existencia es más difícilmente demostrable, y la escuela de Bier (228), en especial Martin(325-8) y Riess (370), consideraban que el cambium no existe como parte del periostio si no que está incluido en el hueso y sería su zona de transición hacia la capa fibrosa periostal. Dan por el contrario un gran valor a la medular, de la que partirían los influjos hormonales responsables de la proliferación celular. Para estos autores lo más importante es la aparición de un tejido conjuntivo joven, que por acción de los influjos hormonales se --transformaría por metaplasia, en tejido óseo. Es decir, los fibroblastos sometidos al estímulo químico se transformarían en osteoblastos y los factores mecánico y vascular no tendrían gran valor. La célula conjuntiva --joven precisa calcio y el contacto con el hueso vivo para transformarse --en osteoblasto, según Martin.

Jessen dice que la importancia del periostio reside en su aporte --vascular. Frente a Bier, Lexer y su escuela y W.Müller (289,316,337),etc., conceden un papel preponderante al periostio con sus células osteoblásticas de la capa cambial, que proliferan dando lugar al hueso nuevo. Lexer no aceptaba la existencia de metaplasia sino que, para él, las células --de estirpe ósea en reposo serían las responsables, tras su proliferación, de la osteogénesis. El periostio jugaría además un papel muy importante por el aporte nutritivo vascular, describiendo Lexer la hiperemia que --acompaña a todo callo. El valor de estas células para las fracturas es --claro según Lexer, ya que, el estímulo lesional desencadena una rápida --proliferación celular que no es nunca tan intensa en los casos de injerto óseo. Los trabajos de Axhausen y Bassett (218) señalan la importancia de la persistencia de las células cambiales para la osteogénesis en el --autotrasplante, cuya vitalidad contribuyen a mantener. Axhausen en 1956, postulaba la estimulación de la osteogénesis en el huésped a partir del --injerto, por contacto entre las prolongaciones de los osteoblastos del injerto con las células conjuntivas jóvenes de su lecho receptor.(219,288).

Cohen y Lacroix ( 245 ) dicen que la capa cambial responde en el injerto igual que en las fracturas. Blaisdell ( 229 ) dice que el perios\_ tio tiene un papel claramente osteogénico.

Laxer aceptaba también un papel osteoformador a partir de las otras células de las superficies óseas, es decir, del endostio principalmente , ya que la función de los canales de Havers fue poco conocida por los au\_ tores clásicos. En la curación de los defectos óseos Bier daba un papel más importante a las células de los canales de Havers, considerando que - sólo la osteogénesis de ese origen era capaz de producir una "restitutio ad integrum ". Lo mismo que Martin, Lexer acepta que la medular es siem\_ pre osteoformadora mientras no se interrumpa su circulación o se someta - a influjos mecánicos nocivos. (151B, 227,240,252,285,291,301-3,411-14).

Bauer, König ( 222,303 ) señalan un papel preponderante al teji\_ do medular al que dan una función organizadora del regenerado óseo, en - el sentido de que su adición produce siempre un regenerado de mayor cali\_ dad, como ya había señalado Bier.

A pesar de los datos de Katzenheim ( 292 ) los trabajos de Bauer, Koch ( 301-2 ) , etc., indican que en las fracturas la unión del callo pe\_ riostal con el medular origina el callo intermediario, que aparece a ni\_ vel del trazo entre las corticales. Melcher (331-2) señala en este senti\_ do que el relleno de los defectos corticales se hace a partir de la medu\_ lar, pero que el callo periostal también interviene, de forma que cubre - al otro y permite la reabsorción de sus porciones exuberantes. Bassett - añade la proliferación originada en los canales de Havers y sugiere que - en el cabo proximal la reacción es más rápida que en el cabo distal.

Zuckmann(412-14) y cols. consideran tanto al cambium periostal co\_ mo a la medular fundamentales, y afirman que en las fracturas el perios\_ tio tiene más importancia durante las fases precoces del callo. No adop\_ tan conclusiones en lo que se refiere a los mediadores químicos de la res\_ puesta.

En la actualidad todos los autores, como ya hemos referido, aceptan la existencia en el animal adulto de una capa cambial de células que, se --  
gún Pritchard (43), podrían considerarse como osteoblastos en reposo, o --  
preosteoblastos según Rasmussen, que tras la producción de la fractura, --  
tanto en el animal joven como en el adulto proliferan. En los estudios se  
riados de Dieterich, Asada, Tonna (388-91), etc., la respuesta celular apa  
rece definida claramente a las 16 horas de la fractura, y en los días si -  
guientes aumenta el acúmulo celular que se coloca entre la cortical y la -  
capa fibrosa externa del periostio. Algunos autores clásicos han interprete  
tado que las células rellenan el espacio creado al desgarrarse y separarse  
el periostio, en tanto que, la mayoría en la actualidad consideran que  
estas células, producto de la proliferación periostal, separan activamente  
el periostio de la cortical.

El origen de estas células ha sido uno de los más debatidos en la -  
literatura, hasta que ha existido la posibilidad de introducir marcadores  
celulares que permitan trazar el devenir de una serie de células en una po  
blación en crecimiento, como es el callo.

Asada (216) en sus estudios seriados encuentra que la proliferación  
celular es manifiesta hacia las 15 horas tras la fractura y surge, según él,  
de las células de la capa cambial, donde se aprecian abundantes mitosis. Es  
ta capa va creciendo en altura hasta que a los 2 ó 3 días se diferencia en  
una zona interna y otra externa formada por varias capas de células -3 ó 4-  
fusiformes, paralelas a la cortical, en las cuales siempre es posible apre-  
ciar la presencia de mitosis, en especial hasta el 6º día en el que el ca -  
llo está muy desarrollado. Para Asada, la reacción no aparece por igual a -  
lo largo del periostio, en las fracturas completas no se manifiesta hasta -  
una cierta distancia del trazo de fractura porque a su nivel el periostio -  
está desprendido y no muestra actividad celular, es la zona que corresponde  
al área de necrosis cortical. A partir de ahí y a escasa distancia, alcanza  
la proliferación celular un máximo, para disminuir en declive a lo largo de  
la diáfisis hacia sus epífisis. Se puede encontrar mitosis en el periostio

engrosado a bastante distancia del trazo de fractura.

Los estudios de Ham (277) en 1930 indicaban que la proliferación celular además de crecer en espesor tendía a dirigirse hacia el hematoma, de forma que los acúmulos celulares subperiostales de ambos fragmentos - fracturarios tendían a reunirse. Según Rokannen, Duriez, Coutelier, etc. (260,384), más importante que la colonización del hematoma, es la proliferación celular descrita.

Tras la introducción de los isótopos en la clínica, se han utilizado desde Bohr (230) los mismos en el estudio de la cinética celular del callo. (223,230,336)

Para el estudio de la respuesta periostal, Tonna (388), Hildebrand, Manabe, etc., (296,324,390) emplean la timidina tritiada con la que han podido observar que a partir de las 16 horas tras la fractura, había un aumento del marcado celular periostal que mostraba su máximo a las 32 horas, momento en el cual se marca el 25% de las células periostales.- Este marcaje no se limita a la zona perifracturaria sino que se extiende a lo largo de toda la diáfisis, con menor intensidad, hasta el 5º día. - A nivel de la fractura disminuye el marcado lentamente, de forma que a los 14 días sólo quedan marcadas el 6% de las células. Es de señalar que en el periostio idemne del animal joven se marca la capa cambial hasta el final del crecimiento, en tanto que la capa externa se marca muy raramente. En el animal adulto se marcan en situaciones normales sólo el 0,7% de las células de la capa cambial. Después del traumatismo, en los animales -- adultos Tonna (389) dice que se produce la misma respuesta celular que - en el animal joven, pero de menor intensidad llegando sólo al 18% el número de células marcadas y en lugar de alcanzarse el máximo a las 32 horas, sucede al 4º día.

Estos estudios dejan, pues, fuera de toda duda que la capa interna del periostio es la responsable de la proliferación celular osteoformadora. Los estudios histológicos señalan que la célula que se marca en las

primeras fases y capas más externas, es morfológicamente muy similar a los fibroblastos y presenta una serie de transiciones hacia el osteoblasto típico de las capas más internas. Se diferencia de los fibroblastos de la capa periosteal externa, en que éstos no captan el isótopo en ningún momento después de la fractura. Morfológicamente la célula en reposo y el fibroblasto no son claramente diferenciables. Esta célula de cuyo origen volveremos a hablar posteriormente, se la conoce con nombres diversos, bien célula osteoprogenitora de Ham, preosteoblasto, etc.. La mayoría de los autores coinciden en que se trata de una célula mesenquimal pluripotencial, que entra en mitosis después del traumatismo dando lugar al osteoblasto en pasos sucesivos, es decir, la célula osteoprogenitora daría lugar al preosteoblasto y éste al osteoblasto, el cuál, como ya sabemos, al quedar incluido en la matriz ósea se transforma en osteocito. Tonna (391) en estudios de perfusión continua con timidina, encuentra dos tipos de poblaciones celulares en el cambium, un grupo que se divide y otro que permanece estático a lo largo de todo el proceso de evolución del callo.

Esta célula no sólo es capaz de dar lugar a los osteoblastos, sino que también produce condroblastos, como ya se conoce desde los estudios clásicos. Manabe, Shima y Yamanuchi (324) 1975, con azufre marcado y con prolina y timidina tritiada, parecen demostrar que la célula mesenquimal se divide de una forma más rápida en las fases más precoces tras la fractura. A las 24 horas el 15% de las células están marcadas, alcanzando el 90% a las 21 horas postfractura, con lo que sólo habría un 10% de células de la capa cambial que permanecerían en estado G<sub>0</sub>. El análisis del ciclo de reproducción celular a las 24 horas postfractura, muestra, según Manabe y cols., que el tiempo de generación, G.T., es de 23 horas y el de duplicación del A.D.N., la fase S, es de 2 horas.

La fase postduplicación o G<sub>2</sub>, abarca también 2 horas y el índice de mitosis es 0,07, siendo el tiempo de la mitosis 1,6 horas. G<sub>1</sub> corresponde a 17,4 horas para las células osteoprogenitoras. A las dos semanas

ha disminuido el tanto por ciento de células marcadas de forma que a las 12 horas, tras la administración del isótopo, el porcentaje es sólo del 25%. La fase G.T. ha disminuido a 15 horas en tanto que la fase S ha subido a 3 y la fase  $G_1$  queda en 14,4 horas. Así, aunque el tiempo de generación celular ha disminuido, el número de células que se dividen ha descendido claramente, lo que está en relación con las necesidades del momento para la reparación de la fractura, que de alguna manera se autocontrola y rige la población celular incorporada a la reparación fracturaria.

Según Manabe los osteoblastos son también capaces de dividirse y muestran un ciclo celular de generación diferente al de las células osteoprogenitoras, que estos autores llaman mesenquimales. Esto va en contra de la opinión de la mayoría de los autores. Manabe encuentra a la semana un tanto por ciento de osteoblastos en división, pero no establece una clara diferencia entre los preosteoblastos propiamente dichos y los osteoblastos en la terminología aceptada por los demás autores. Para esta célula más diferenciada que aún se divide, la fase  $G_1$  es de 20 horas, la fase S corresponde a dos horas, siendo la fase  $G_2$  de seis horas y el tiempo de mitosis 0,4 horas, así como  $G_1$  1,6. A las dos semanas, tras la fractura, el porcentaje de células marcadas sólo es del 31% a las 18 horas -- tras la administración del isótopo con una fase G.T. de 21 horas y una fase S de 3 horas así como una  $G_1$  de 11,6. En este grupo celular cae, como en las células progenitoras, el número de células en división, pero caen proporcionalmente menos. La diferencia en el ciclo celular marca una separación clara de las dos poblaciones celulares y el paso paulatino de las células en división a las células funcionantes. (24,40,41,45,49,53)

Por último dice Shima que de las células cartilaginosas derivadas de las células mesenquimales indiferenciadas, algunas aparecen marcadas en la primera semana tras la fractura, pero no muestran mitosis.

Corroboran estos datos los estudios de Gudmunson y Semb (254-55) -- que demuestran que tras la fractura, en las poblaciones celulares del ca



llo , hay primero un aumento del A.D.N. seguido después de un aumento del A.R.N. El aumento del A.D.N. se mantiene durante las tres primeras semanas, para mostrar a los 30 días un valor cercano al normal. El máximo se alcanza entre el 6º y el 14 día y es 2 a 3 veces su valor normal. Disminuye después de manera progresiva, pero a los 60 días aún se demuestra -- una actividad aumentada, señal de que se mantiene la proliferación celular durante el remodelado óseo.

El A.R.N. aumenta por 4, y alcanza su máximo entre 9 y el 21 días postfractura. Estos datos confirman que en las fases más precoces hay una gran proliferación celular que disminuye después para ser sustituida por una fase de mayor actividad funcional, como indicaría el aumento del A.R.N y su conocida relación con la síntesis proteica, que estaría por tanto también aumentada.

Antes de continuar con el estudio del callo, vamos a referirnos a las teorías de Dieterich, Judet, Trueta, (258,291,395-99), que señalan -- como origen de la célula osteoprogenitora al endotelio vascular, del cuál se liberarían las células productoras del tejido de granulación reparador.

Dieterich (258 ) en 1926 en su estudio sobre el callo, demostró -- también en éste la separación de la capa fibrosa del periostio de la cortical, por un acúmulo celular que puso en relación directa con los vasos y señaló que en la capa más interna del periostio había un gran aumento -- de los vasos, de capilares, lo que discute Asada diciendo que, con las -- técnicas entonces en uso, dichos vasos sólo era posible visualizarlos a partir del 2º al 4º día postfractura. Dieterich afirma que hay una neoformación de vasos por brotes de yemas capilares a partir de los previamente existentes, que se rodean de células que en la vecindad de los capilares se asemejan mucho a las células endoteliales de las que derivan y a medida que se van separando de los vasos se transforman, se hacen más -- grandes, ovoideas y toman aspecto de osteoblasto rodeándose posteriormente de la matriz ósea correspondiente. Dieterich describe el mismo proceso

so en las partes blandas perifracturarias, y sugiere que en el callo, --  
igual que en los procesos inflamatorios, como ya señalaba Marchand, hay --  
una proliferación capilar cuyas células endoteliales por mitosis liberan  
células mesenquimales embrionarias pluripotentes de las que se origina --  
rían por maduración los osteoblastos.

Allgöwer (211 A) en 1955, estudiando el número de mitosis en la re --  
generación de las heridas, postula, siguiendo a Maximow, que hasta las 36  
horas el infiltrado celular se produce por invasión a partir de células --  
circulantes, monocitos, que tras diapedesis se transformarían " in situ " --  
en fibroblastos. Solo a partir de ese momento comenzaría la producción --  
real de células por el tejido. En 1973 Allgöwer dice que no se puede --  
afirmar claramente si las mitosis que se describen en el acúmulo inflama --  
torio son de las células locales o las de los monocitos emigrados, como --  
había postulado primitivamente.

Trueta (253 ) suscribe esta idea y considera que en el callo lo --  
más importante es la proliferación angioblástica, que según Anderson en --  
la vida postembrionaria se hace por gemación sólida y permeación poste --  
rior del brote así formado. Los estudios de Trueta con el M.E. y de Ri --  
gal con isótopos parecen demostrar que hay mitosis de las células endote --  
liales, cuyos elementos hijos emigran en parte al tejido vecino, donde --  
por pases intermedios llegan al osteoblasto. Señalan que las células de  
esta cadena permanecen en contacto a través de las prolongaciones celula --  
res. Hay que señalar por último que Trueta (268 ) considera que la muer --  
te celular y el cartílago hipertrófico degenerado, tienen una acción qui --  
miotóxica sobre el brote vascular. Con Allgöwer podemos pensar que las --  
dos fuentes contribuyen a la respuesta proliferativa celular.(211 B)

Hay que citar, además, el trabajo de Kahn y Simmons (292 B ) que --  
han analizado el comportamiento celular en injertos óseos heterólogos im --  
plantados en animales cuyos fenómenos inmunitarios no están desarrollados,

y donde el injerto puede vascularizarse por vasos del huésped. Estos autores han encontrado que las células del periostio y del endostio en el in - jerto asimilado provienen del dador, en tanto que las de la cavidad medu - lar y las mielopoyesis proceden del huésped. Las células clásticas tienen un origen doble e incluso sería posible la fusión de células de los dos -- orígenes para dar lugar a las multinucleadas.

En el estudio de las células óseas indiferenciadas perivasculares , Cameron ( 20 ), siguiendo a Scott ( 49 ), distingue dos tipos; las células A equivalentes a osteoprogenitoras de Young, que desde las células fusi - formes perivasculares con gran núcleo y pocos granitos, se transforman en células de mayor tamaño, con un retículo endoplásmico muy abundante que - asienta sobre la trabécula ósea y corresponden a los osteoblastos.

Vamos a estudiar ahora lo que sucede con la proliferación celular - en las diferentes fases por las que pasa el callo. Asada distingue una fa - se proliferativa, una de diferenciación, una de remodelado y una de regre - sión. Duriez (260) lo simplifica considerando una fase de urgencia y una fase posterior de retorno a la normalidad, siendo el callo un proceso bifá - sico. En las primeras 12 semanas hay un aumento de la masa ósea que en el primer mes está poco mineralizada. Hasta las 22 semana postfractura se - producen los fenómenos de remodelamiento. Desde el punto de vista de la - solidez del callo. Falkenber ( 317) encuentra que la resistencia a la ten - sión crece muy deprisa, pero la resistencia específica ósea aumenta mucho más lentamente.

Sabemos que la proliferación celular que comienza hacia las 16 ho - ras alcanza su máximo a las 32 horas, pero el callo sigue creciendo hasta el 6º a 7º día según Asada, y para Ennenkin alcanza el volumen máximo ha - cia el 10 ó 12 día, aumentando hasta el 20 día aproximadamente según del - Torto. Ya a los 2 días comienzan los procesos de diferenciación en esa ma - sa celular, se separa una capa externa, formadora de células, integrada - por elementos fusiformes, colocadas en paralelo a la cortical y una capa

interna de células claras, redondeadas. La diferencia está plenamente desarrollada hacia el cuarto día. No sólo hay variaciones en el tiempo sino también en el espacio, así Bruns afirma que las partes de la reacción periostal alejadas del foco, se transforman directamente en hueso trabecular como confirma Zuckman y dice que esta osificación conjuntiva se produce siempre en torno a los vasos. Por el contrario, en la zona más próxima al trazo de fractura la masa celular se presenta en un principio amorfa y desprovista de vasos que, según Ham, quedan en las capas más externas o en inmediato contacto con la antigua cortical donde también es posible ver la aparición de hueso desmoide. Para Ham la osificación desmoide tiene lugar porque las células están en contacto con el hueso antiguo y hay vasos. En la masa central las células toman un aspecto redondeado y se rodean de una matriz orgánica metacromática que acepta las tinciones propias del cartílago.

Primero tiene lugar la aparición de un tejido condroblástico que con el paso de los días se transforma en cartílago maduro semejante al cartílago hialino y desprovisto de vasos; su desarrollo es claro al 4º día para Brighton (235). Esta masa cartilaginosa que crece por aposición desde el periostio confluye, según Ham y Coutelier, con el manguito cartilaginoso del otro extremo fracturario para dar lugar a una soldadura provisional de la fractura. Esto sucede antes de que se restablezca la continuidad del periostio propiamente dicho, infiltrando el hematoma. La invasión del hematoma por el tejido de granulación de las partes blandas vecinas, contribuye a la diferenciación cartilaginosa.

Externamente al cartílago, tiene lugar una nueva fase de osificación trabecular por transformación directa de las células en osteoblastos, siempre en contacto con los vasos. Esta capa toma aspecto más denso y aparecería desde el principio como hueso laminar.

En cuanto al origen de las células cartilaginosas, si bien han existido discusiones en torno y se pensó por algunos que podrían tener un origen diferente, Dieterich, Asada, etc., afirman que el origen es --

siempre la célula osteoprogenitora y en este sentido, recordamos los trabajos de Manabe ( 324) y de Duthie y Baker (261,262) con  $S^{35}$  que se deposita en las zonas metacromáticas de aspecto cartilaginoso, que acabamos de describir.

Manabe ( 324) encuentra que los osteoblastos captan más y liberan más deprolina al tejido cartilaginoso en el callo de 2 semanas. Por el contrario los condroblastos captan y liberan el  $S^{35}$  más rápidamente que la hidroxiprolina, en especial a las dos semanas postfractura. La eliminación y captación son más acentuadas en las células hiperplásicas. Tiene mayor interés relacionar estos valores con la célula mesenquimal progenitora en la cual Manabe diferencia dos subgrupos. Las células indiferenciadas que darán lugar a los precondroblastos y al cartílago, muestran en la zona de transición un mayor metabolismo para el S, mientras que las que originarán el tejido óseo tienen un mayor metabolismo de hidroxiprolina.

Las células cartilaginosas que en la primera fase del callo muestran zonas de transición gradual con las trabéculas óseas apuestas directamente sobre la cortical, al madurar el callo tienden a adoptar una estructura similar a las de las fisis, en el sentido que toman aspecto columnar y aparece una hipertrofia de las células que se localiza en la periferia de la masa cartilaginosa donde se observa su invasión vascular y su reabsorción. En esta fase, el callo cartilaginoso queda limitado externamente por una capa ósea muy fina y por su transformación en hueso trabecular desde las zonas más periféricas, que adopta una disposición en "V" de base opuesta a la cortical. En el animal de experimentación, por ejemplo en los roedores, aparece esta disposición hacia el 15 ó 20 día de evolución, estableciéndose así una estructura compleja análoga al cartílago de crecimiento.

Más alejado del trazo de fractura, tiene el callo una osificación directa y sus trabéculas presentan una disposición oblicua a la cortical, fenómeno que según Trueta se debe a que los vasos se dirigen desde las zonas periféricas sanas hacia el punto de máxima lesión, en tanto que Couté

lier lo interpreta como secundario a la orientación de las fibras colágenas que anclan el periostio al hueso y determinan, tras la proliferación celular, que ésta se dirija oblicuamente hacia la epífisis.

La masa cartilaginosa recién formada, es invadida en sus porciones periféricas por cordones celulares que provienen del periostio y que en el centro siempre llevan un vaso que va rodeado por varias capas celulares. El avance de esta invasión se produce al comienzo por brotes endoteliales. Según Dieterich y Asada, los condrocitos no se manifiestan hasta el 6º día aproximadamente. Hacia el 4º día empiezan a formarse los espacios medulares por separación de la pared endotelial de la capa de células indiferenciadas que le acompañan y que quedan adheridas a la matriz cartilaginosa, sobre la cuál se produce un depósito de osteoide que se calcifica.

La opinión general de los autores es que las células cartilaginosas mueren durante la invasión del cartílago por los brotes capilares.

Se produce después, poco a poco, el remodelado de las trabéculas y su disposición, que en un principio era oblicua o abigarrada, se reorienta colocándose paralelas a la cortical para ir desapareciendo cuando la continuidad de las corticales se ha restituido.

Los osteoblastos que producen este nuevo tipo de hueso tienen una morfología diferente a los que han producido el hueso trabecular primario según Duriez.

Es de señalar que este remodelado de las trabéculas comienza de manera muy precoz y afecta, no sólo al callo externo, sino además a las corticales que muestran un ensanchamiento de los canales de Havers existentes, y una perforación por abundantes vasos neoformados que llevan a su transformación esponjosa, de forma que en las fases tardías del callo es difícil reconocer la extensión exacta de las primitivas corticales.

Antes de pasar a considerar dos puntos muy importantes, como son el por qué de la producción cartilaginosa y los estudios particulares de la vascularización, nos vamos a referir a la producción del callo medular.

#### Callo medular .-

Al tratar del callo medular volvemos a encontrar la antigua polémica, ya descrita previamente, entre los partidarios de la función preponderante del periostio y los defensores de la primacía endostal. El origen de sus células está sometido a la misma discusión que para el periostio, por una parte están los autores que defienden su origen vascular, y por otro los seguidores de su origen a partir de las células de la superficie endostal. Desde Bruns, todos los autores aceptan la existencia del callo medular y su osificación directa por transformación de las células proliferantes en osteoblastos, no siendo frecuente la aparición de cartílago, salvo en los casos de gran destrucción de la circulación medular.

Hacia el segundo o tercer día, se aprecia claramente la existencia del callo endostal. El tapón del hueso esponjoso así formado crece hacia el otro fragmento, reuniéndose con él siempre que no haya grandes desplazamientos y, según Zuckman y Rhinelander, antes de que los brotes periostales se pongan en contacto. En las formas muy desplazadas, por el contrario, es el callo periférico el que produce la primera unión. A partir del sexto día aproximadamente, el callo endostal toma contacto en torno a los extremos fracturarios con el callo periostal y contribuye a la reabsorción osteoclástica y a la revascularización de los extremos corticales que habían quedado muertos por la falta de aporte sanguíneo. (369,411).

Por último hay que señalar, que una vez realizado el remodelado de la cortical y de las trabéculas interpuestas que se diferencian durante mucho tiempo por su orientación cambiada, no paralela a la cortical y las lí

neas cementantes que las separan, el callo medular desaparece restableciéndose la continuidad del canal medular y de su circulación.

Frente a esta teoría Coutelier ( 246 ), apoyándose en sus estudios y en los de Hulth y Olerud ( 286-87 ), afirma que el callo endostal en estas condiciones mecánicas no juega un papel preponderante, e incluso no contribuye a la soldadura ósea.

Ham ( 278 ) en 1973 discute el origen del callo medular a partir, - por un lado, de las células de la superficie endostal medular y de los canales de Havers, que no relaciona con los vasos sino con la capa cambial - del periostio que quedó incluida en el hueso durante el crecimiento. Por otro lado, habla de células circulantes derivadas de la médula roja a partir de cepas monoclonales, que por inducción serían capaces de producir - hueso. Considera que el callo medular se debe a la presencia de células - con potencial osteogénico que han quedado incluidas en la médula. Quizás sea más correcta la opinión de que la célula mesenquimal, indiferenciada del estroma de la medular por el influjo de la fractura, responde igual que a nivel del periostio y de la superficie endostal dando lugar a una neoformación ósea. (251 B, 260).

Hemos de citar aquí, sin entrar en profundidad en ellos, los estudios bioquímicos, histoquímicos e isotópicos que, al margen de los reseñados, nos van a indicar las diferentes fases por las que pasa el callo en relación a la síntesis de su matriz extracelular y su mineralización.

Del Torto, Udupa y Prasard, Gudmunson (274,356-57) estudian las variaciones en el tiempo de la síntesis proteica. Este último determina los niveles de LDH en el callo, encontrando su concentración máxima al noveno día postfractura.

Bohr ( 230 ) inició el estudio isotópico de la mineralización del callo y con el  $P^{32}$  pudo observar que el aumento del metabolismo mineral no -



se limitaba a la zona del callo sino que se extendía a todo el hueso afecto, como hemos descrito ya. El depósito máximo de  $P^{32}$  se produce en torno al 14 día tras la fractura, pero su metabolismo permanece elevado aún al cabo de cuatro meses. Cartier y De Bernard ( 242 ) 1956, encuentran que durante los veinte primeros días tras la fractura hay una avidéz es casa por el isótopo, que aumenta rápidamente entre los veinte y veinticinco días postfractura, depositándose el 75% del mineral en diez días. Al estudiar el hueso fracturado por zonas, ven que al principio los extremos fracturarios aumentan su contenido en P en un 10%; para a los 25 días perder un 30% de su contenido mineral que aumenta de nuevo paulatinamente. - El resto de la diáfisis presenta una osteoporosis generalizada que alcanza el 30% del contenido mineral a los veinticinco días de la fractura.

Lemaire ( 314 ) 1966 no encuentra, haciendo análisis de la calcemia, variaciones de la misma; pero demuestra una movilización general de  $Ca^{++}$  del esqueleto y de acuerdo con Bauer ( 223 ) halla un aumento del depósito mineral en el hueso fracturado que se hace máximo a las tres semanas de su rotura. Al analizar el hueso regionalmente observa, igual que La - grange, una osteopenia del mismo con un acúmulo proporcionalmente mayor - en las zonas poco mineralizadas, lo que significa una mineralización progresiva del callo. Mateini y Johansen han aplicado estos datos a la clínica, para analizar el desarrollo de las pseudoartrosis durante el tratamiento de las fracturas diafisarias humanas.

Lindholm y cols. ( 318B, 319, 320 ) 1967, 69 y 70, han estudiado extensamente el comportamiento de las células cebadas, resucitando así los trabajos de Partsch y Billich, y de Maklin, quienes dan a las células cebadas un significado macrofágico eliminadoras de detritus proteicos. Estas aparecen ya a las 24 horas de la fractura, alcanzan su máximo a los 6 -- días y a las 3 semanas han desaparecido. Se localizan de preferencia a nivel de los canales medulares. Según estos autores no influyen en el desarrollo del callo propiamente dicho. Lindholm describe gránulos citoplasmáticos metacromáticos en el interior de las células cebadas, y los consi

dera como MPS. Estas células se ubican de forma preferente en torno a las zonas cartilaginosas, por lo que las relaciona con el proceso de calcificación y, para él, su presencia en el callo tiene el mismo significado que la mastocalcificilaxis descrita por Seyle. Hoy, como sabemos, parece más probable que sean los osteoblastos los responsables directos de la calcificación, con lo cual las células cebadas deben tener algún otro significado y por su producción de histamina podrían estar en relación con el desencadenamiento de la respuesta inflamatoria o su persistencia, ya que, Lindholm ha demostrado su permanencia en los casos de pseudoartrosis y de inestabilidad del foco fracturario. (318 A)

Monticelli ( 335 ) hace una revisión muy extensa de los procesos -- bioquímicos a nivel del callo hasta 1955. Pankovich y cols. ( 350 ), -- Hulth y Olerud ( 287 ) estudian el influjo de la sobrecarga de corticoides en el devenir del callo. Ziegler y Dellling ( 350 ) el de la calcitonina. Rothman ( 374 ) analiza la influencia de la deficiencia de hierro y Gudmunson ( 276 ) los efectos de la difenilhidantoina sobre el callo. Herold (283 ) considera la acción de la hormona del crecimiento y el factor sulfatante de Daughaday, Sobel ( 238 ) del condroitinsulfato y Koskinen ( 304 ) la influencia de la presencia o ausencia de los diferentes órganos endocrinos en el desarrollo del callo. Lindholm ( 317 ) y W. Mueller estudian el efecto de las dietas pobres en calcio y vitamina D. Rokanen (385) el de la heparinización sobre el volumen y resistencia del callo. Jarry y Uthoff ( 401 ) hallan una estimulación del callo tras la petalización -- diafisaria en torno a la fractura, de acuerdo con Willich ( 406 ), Judet ( 291 ) y Prasard (356 ). Penttinen (279 ) demuestra, por otro lado, que el ejercicio previo favorece el desarrollo y resistencia del callo.

#### Vascularización .-

Después de haber hecho constantemente referencia a los vasos, vamos

a estudiar ahora someramente los hallazgos obtenidos mediante las técnicas de inyección vascular. Esta no es la única manera de aproximarse al problema, la otra es estudiar el flujo vascular en el hueso afecto, en especial mediante el aclaramiento de isótopos como hace la escuela de la clínica Mayo encabezada por Kelly ( 383 ). La distribución vascular normal para el hueso se nutre de una serie de vías de aporte distinto, como son, según Trueta:

1. La arteria nutricia que da más del 50% del flujo óseo y es el aporte hemático principal de la diáfisis.
2. Las arterias perforantes epi y metafisarias que se encuentran separadas durante el crecimiento, formando después un sistema único que aporta entre el 20 y 40% de la circulación que va dirigida a los extremos óseos.
3. Los vasos periostales son más difíciles de evaluar, según Trueta, quién con Forster y Kelly ( 396 ) llega a la conclusión que los dos tercios internos de la cortical se nutren a partir de la medular, en tanto que el tercio externo lo hace a partir de los vasos periostales. La circulación, aunque es principalmente centrífuga, puede pasar a través de las comunicantes desde el periostio hacia el interior, es decir, invertir su sentido hasta transformarse en una circulación centrípeta.

La arteria nutricia, cuyos estudios comenzó Lexer en 1901, al penetrar en la cavidad medular se divide en dos ramas, dando lugar a una serie de arterias radiales según Kelly. A lo largo de su trayecto al dirigirse hacia los extremos donde contribuyen, durante el crecimiento, a formar los vasos metafisarios; los vasos radiales son los que suplen los sistemas haversianos. Existe una gran discusión en torno a la dirección de la circulación; encontramos una revisión en Kelly ( 383 ). Para Brookes ( 237 ) y Mc Naab ( 409 ) la circulación es totalmente centrífuga desde la

medular hasta la cortical saliendo por el periostio, en tanto que Bränermark (248) considera que la sangre suplida por la arteria nutricia a la cortical, vuelve posteriormente a las venas sinusoidales y centromedulares. La parte externa de la cortical, que Trueta afirma se nutre a partir de sistema periostal, drena, según Bränermark, al exterior. Danckwardt-Lillieström señala que el flujo venoso vuelve a la medular o sale a las venas periostales de acuerdo con las diferencias de presión existentes entre la medular y el exterior. (253,294,300,307,33,348,364-65,408).

Brookes (237) dice que la cortical se suple por tres sistemas -- que son independientes entre sí. La arteria nutricia determina una circulación centrífuga siendo la fuente principal; las otras dos serían los capilares procedentes de las inserciones musculares y del periostio que tienen, según Brookes, un valor muy escaso al estar toda la cortical suplida por la circulación medular. Göthman describe la existencia de capilares, que ponen en contacto directo la circulación medular y la periostal a través de la cortical.

De Marneffe afirma que la parte central de la cortical diafisaria se nutre a partir del periostio y sólo las corticales metafisarias lo hacen a partir de los vasos medulares.

Ray analiza el flujo y sugiere que el 5,4% del volumen de eyección cardiaco corresponde al esqueleto y, en el perro a nivel del fémur, el 88,4% del volumen circulante se dirige a la cortical diafisaria y el 11,5% a la medular. (292,363-65).

Rhineland, de acuerdo con Ham, considera que los sistemas haversianos están repletos de capilares longitudinales derivados de los vasos periostales, que quedaron incluidos en la cortical durante el crecimiento y se conectan a través de los canales de Volkmann con las circulaciones medular y periostal. Las inserciones musculares tienen gran valor al aportar una vascularización suplementaria a su nivel. Ham indica que el

estado funcional tiene gran importancia, ya que p.e., tras la fractura la diáfisis homonima controlateral presenta un aumento del flujo de hasta 2/3 su valor normal, por apertura de canales vasculares habitualmente cerrados.

Los estudios de Shim (408 ) indican que la arteria nutricia aporta entre el 30 y el 70% de la circulación de la diáfisis. Vemos , pues, que el aflujo principal de los huesos adultos se hace por la arteria nutricia, con un aporte controvertido por parte de la circulación periostal y con un flujo principalmente centrífugo; pero que de acuerdo con Brånermark , está sometido a las diferencias de presión existentes entre la cavidad medular y el exterior, de forma que con la contracción muscular puede haber un drenaje parcial de la sangre cortical hacia las venas sinuoidales medulares. Existen variaciones locales de acuerdo a las condiciones anatómicas particulares de cada porción ósea y con las inserciones musculares de cada punto. Shim hace una revisión de los factores metabólicos, hormonales y nerviosos que influyen sobre la circulación ósea.

Vamos a ver ahora las alteraciones que puede sufrir la circulación como consecuencia de las fracturas, refiriéndonos como hasta ahora a las formas experimentales cuyo callo hemos descrito, es decir, las formas sin inmovilización o a lo sumo con inmovilización por yeso. Lexer en 1904 y en 1922 y W. Müller fueron los primeros en ocuparse de las alteraciones vasculares que ocurrían como consecuencia del traumatismo, encontrando que la fractura desencadenaba una hiperemia. (316,337)

Los estudios de Judet en 1960 y de Roy Camille en 1966, indican que hay cuatro fases en el proceso vascular :

1ª fase .- Durante la primera semana postfractura, la llamada fase inerte, sólo hay un aumento de la circulación del fragmento en el que persiste la arteria nutricia.

2ª fase .- En la segunda semana aparece una gran actividad vascular -

lar con formación de vasos en torno al trazo de fractura y aposición ósea en su vecindad.

3ª fase .- Aparece entre la 3ª y 6ª semana, muestra que la actividad vascular va disminuyendo al tiempo que el callo se osifica y se hace más estable.

4ª fase .- Se caracteriza por una vuelta a la normalidad.

De acuerdo con las fases descritas, Judet establece una clasificación de las pseudoartrosis en: 1) avasculares; cuando se instauran antes de la fase de proliferación capilar y son peculiares de puntos anatómicos concretos, como las fracturas subcapitales del fémur. 2) pseudoartrosis hipervasculares; que se manifiestan en los demás puntos del esqueleto y se caracterizan porque la fase de hipervascularización no regresa. (268,291).

Wray ( 408 ) demostró que inmediatamente después de la fractura se incrementa el flujo vascular del miembro afecto , lo que en una primera fase se debe a un acúmulo venoso. Esta respuesta vascular depende de la edad, de forma que en animales viejos la respuesta es menor.

Kelly ( 313 ) 1969, usando el aclaramiento de  $\text{Sr}^{85}$  encuentra un aumento del flujo vascular al día siguiente de producida la fractura. Aumento que es progresivo y alcanza su máximo a las dos semanas. A los diez días es 0,1061 ml/cc hueso/sg, habiéndose multiplicado por 6 el flujo, que disminuye a continuación hasta una actividad de 3,7 veces su valor normal y se mantiene en meseta entre el 30 y el 70 día, a los 21 días es 0,0531 ml/cc/sg. Alcanza su valor normal hacia el 90 día postfractura aproximadamente.

Al comparar Paradis y Kelly estos datos con el depósito mineral en el callo, encuentran un paralelismo entre ambos fenómenos. Sus datos igual que los de Rhinelanders indican que con este aumento del flujo, el tiempo -

de permanencia de los isótopos a nivel óseo es menor y por tanto, existe o un aumento en el número o en la permeabilidad de los vasos , siendo la primera alternativa la más probable. (348,368).

Bosch ( 237 ) señala que la perfusión no es uniforme a todos los - niveles.

Kellerova ( 359 ) y col. estudian el retorno venoso en personas - tras fracturas de la tibia, y hallan un aumento del mismo entre la 1ª y la 12ª semana para volver después a la normalidad de forma que, los ca - sos que mantienen un aumento del flujo venoso más allá de la 12 semana , evolucionan hacia la pseudoartrosis.

Ray ( 364 ) afirma que el aumento de circulación que se encuentra a nivel de los huesos fracturados no se debe a un aumento de la velocidad - de circulación como afirma Kelly, sino a un aumento del volumen global de sangre que se mantiene hasta la 8ª semana postfractura y está, según él , en relación directa con la masa del callo.

Frente a estos datos de análisis global, hay que considerar los - análisis microradiográficos hechos por Rhineland, Olerud y Hulth, Mau\_\_ rer y Zuckman, ect. (268,329,330,367-9), que estudian los cambios locales de la vascularización.

Olerud y Hulth ( 286 ) estudiando los muñones de amputación en co nejos encontraron, que a nivel del extremo óseo de amputación se producía una reacción que, histológicamente, era similar al callo de fractura. Los vasos aparecen a nivel del periostio con una inclinación oblicua hacia la cortical. A nivel de la medular hay una proliferación de los mismos que irradian en forma de penacho desde la cavidad hacia el exterior.

Zuckman y col. (329-30) en fracturas cerradas encuentran una proli\_\_ feración vascular que no se manifiesta claramente hasta el 7º día, se ha ce franca hacia la 2ª semana y muestra un predominio periostal con un de

sarrollo máximo hacia el 21 día. Los vasos se disponen de manera anárquica en torno al callo de fractura. Afirman que los vasos tienen una relación directa con la osteogénesis. En 1965 ( 330 ) señalan que la vascularización medular establece conexión, a través del callo, con la medular opuesta en torno al 14º día, y a las 3 semana se ha establecido de manera completa la conexión capilar entre la circulación periostal y la medular en cada fragmento y entre ellos. Según Zuckman el fragmento distal recupera su vascularización a partir de los vasos metafisarios en torno al 14 día. Estudiando selectivamente la vascularización periostal demuestran su independencia de la circulación medular hasta el 15 día, considerándola fundamental para la consolidación ósea.

Los trabajos más exhaustivos sobre la vascularización del callo -- son los de Rhinelander ( 367-369 ) en 1962/67/71, y los de Brookes -- ( 237 ). Rhinelander analiza las variaciones en la vascularización de -- acuerdo al desplazamiento sufrido por los fragmentos. En las fracturas -- sin desplazamiento queda la circulación medular intacta. Se dilatan sus vasos lo cual permite que las diferentes áreas corticales surtidas por la circulación medular no pierdan su aporte sanguíneo. Con el paso del tiempo hay una proliferación vascular a nivel del canal medular y del periostio, que alcanza su máximo a las dos semanas. La nutrición cortical se -- hace a expensas de la circulación medular , que permanece aumentada aún -- después de restablecida la continuidad ósea. A nivel del callo, los primeros vasos que penetran son también de origen medular, y con el tiempo establecen conexión con la neoformación vascular periostal en una primera fase a través del callo, para hacerlo después a través de la cortical misma, y llegando a nutrir los vasos periostales de esta forma.

Cuando se desplazan los fragmentos cambia totalmente el cuadro. -- Como consecuencia del desplazamiento se lesiona la arteria nutricia, que pierde así durante una temporada su papel rector. El restablecimiento de la circulación depende de la reducción y buena contención de los fragmentos. En una primera fase predomina el callo periostal que como sabemos -- es voluminoso. Los vasos que lo nutren se dirigen sólo de manera aislada



hacia el trazo de fractura. A partir de la primera semana el callo medular invade el hematoma y a partir de la tercera semana, es decir, una semana más tarde que en las fracturas sin desplazamiento, se establece la conexión entre ambos sistemas capilares medulares hipertróficos. Surge así mismo la tendencia a la anastomosis con el sistema periostal a través de las corticales, lo que en el perro es bien visible a la sexta semana, momento en el que la vascularización medular asume el papel principal. En las fases tardías Rhinelandier encuentra una vuelta a la normalidad de la circulación periostal, manteniéndose la vascularización del callo externo a expensas de la circulación medular a través de las conexiones corticales.

Puranen (359) para comprobar el restablecimiento de la circulación medular y la buena marcha del callo, emplea el estudio de la venografía medular en las fracturas de tibia en el hombre, que muestra un restablecimiento de la continuidad vascular hacia la décima semana, y en los casos en los que no se ha restablecido esta circulación al tercer mes toma una determinación quirúrgica.

Basándose en los datos antes expuestos mantiene Rhinelandier que la cicatrización ósea no se produce nunca de manera primaria a través del callo periostal, sino que se hace siempre a través del medular, y sólo en los casos con gran desplazamiento o gran conminución de los fragmentos, perdura la prevalencia de la circulación periostal durante más tiempo. En las fases tardías, el remodelado del callo tiene el mismo patrón morfológico que las curaciones "per primam" que luego describiremos.

Tiene interés considerar como penetran los capilares en los diferentes tejidos. Como ya hemos señalado previamente, Anderson, Allgoewer, Trueta, Dieterich, Asada, etc. (211,215,397) señalan que los capilares brotan por gemación a partir de mitosis de las células endoteliales, que dan lugar a cordones sólidos que se canalizan posteriormente por liberación de las células centrales.

A nivel del tejido cartilaginoso del callo, según Asada y Dieterich, no se demuestra la presencia de condroclastos hasta el sexto día, lo que concuerda con la opinión de Leriche, Coutelier ( 216,258 ) etc., quienes afirman que las células multinucleadas aparecen tardíamente a nivel del callo, lo mismo que sucede en el hueso normal tras la administración de PTH ( 19,45,98 ). En la revisión de la literatura no hemos encontrado estudios detallados de la penetración vascular en el área cartilaginosa del callo; pero suponemos por analogía, que sucede de la misma forma que en el cartílago de conjunción, ya que, el callo en muchas zonas toma disposición fisaria.

Desde los trabajos clásicos de Ranvier y Langer, existe una discusión en torno a si la invasión del cartílago se hace por un capilar para cada columna isogénica de células cartilaginosas, como quería Ranvier, o por el contrario, como afirmaba Langer, por una serie de capilares que entran en relación con varias columnas isogénicas.

Todos los autores parecen estar de acuerdo en que el capilar es de morfología sinusoide. Según Brookes (237), al llegar a la zona más distal hace un bucle que da lugar a la porción venosa que desembocará en los lagos venosos medulares. Trueta 1960 ( 397 ) es partidario de la teoría de Ranvier, en tanto que Brookes y Anderson se inclinan más hacia la segunda forma, aunque Brookes indica que según el momento de la vida en que se estudian estos vasos pueden presentar una u otra disposición. Cuanto más joven sea el animal más anárquica es la estructura, y los ramos capilares que se anastomosan entre sí entran en relación con varios grupos isogénicos de células cartilaginosas. Por el contrario, en los animales adultos la disposición sería de un capilar por cada grupo isogénico.

En el callo de fractura, aunque no existan datos al respecto, es probable que por su disposición más anárquica y por la mayor rapidez de su desarrollo, la estructura primera, es decir, un capilar para varios grupos isogénicos, sea la disposición vascular existente.

El extremo del capilar, según Trueta, está abierto, según Brookes y Landon y Brookes ( 237 ) en el feto por el contrario permanecería siempre cerrado, limitado en su porción más distal por la membrana endotelial. Tanto Brookes como Anderson ( 215 ) señalan que estos vasos están des - provistos de membrana basal. Anderson ( 215), en estudios con animales ma yores, indica que es posible apreciar la existencia de capilares abiertos, ya que, su extremo se forma por la reunión de varias asas y las células en doteliales crecen hacia adelante pudiendo, en algunos puntos, permanecer - sin reunirse como indicaría la presencia de hematies por delante de las cé lulas endoteliales, en contacto con las láminas transversales de las cápsu las de las células cartilaginosas. Esta pared, según Trueta en 1960 y An - derson, no aparece nunca calcificada.

Junto a esto tiene interés conocer como se realiza la condrolisis, - Brooke, Anderson, Schenk, ( 308B, 376 ) afirman que no se hace nunca por cé - lulas multinucleadas de tipo clástico, sino por células mononucleadas. Pa ra Anderson, la célula que limita directamente con la cápsula cartilagino - sa y que en ocasiones hace de verdadera tapadera para el capilar, tiene as pecto de macrófago, como el de los sinusoides esplénicos. Con el M.E. apa rece con mitocondrias, abundantes lisosomas y vacuolas digestivas, así co mo una membrana de aspecto ondulado y con proyecciones citoplasmáticas . - En ocasiones se ve en su interior depósitos minerales. Por fuera de la cé lula endotelial y muy semejantes a ellas, según Brookes, aparecen células mesenquimales poco diferenciadas que muestran formas de transición hasta - el osteoblasto aplicado sobre la matriz cartilaginosa donde deposita el mi neral, dando lugar a la esponjosa primaria como describe Scott ( 49 ). - Anderson dice que las células endoteliales no son capaces de una fagocito - sis real. Los osteoclastos aparecen más distalmente y están encargados de la reabsorción de la esponjosa primaria.

Schenk considera que la lámina transversal se lisa por células peri - endoteliales y que el depósito de mineral sobre el cartílago se reabsorbe por el contrario por los condroclastos.

Kember ( 296 ) en 1960 estudiando con timidina esta zona, encuentra que las células mesenquimales perivasculares que captan más timidina, -- son las que van a dar lugar a los osteoblastos y acompañan constantemente a los capilares hacia las celdas cartilaginosas hipertrofiadas.

### Cartílago .-

Hemos descrito que en el proceso de curación de las fracturas , clásicamente se considera normal la presencia de cartílago en todas aquellas que se dejan evolucionar sin ningún tipo de sujeción, como en las costillas, o en las que sólo se recurre a una inmovilización relativa como es la que puede dar el yeso. Aegerter trabajando sobre material humano, -- niega que se produzca corrientemente en el hombre cartílago, Rhineland al hablar de la vascularización señala que sólo aparece el cartílago en -- los casos con lesión de la arteria medular. (214,215,225,295).

Desde el comienzo, ha existido la discusión en torno a cuál sea la causa de la diferenciación cartilaginosa. Por un lado están los autores que aceptan el origen mecánico del mismo, y por otro los que atribuyen su causa a la falta de aporte vascular, es decir, la isquemia. Los trabajos conclusivos de Krompecher y Bassett han interrelacionado ambos fenómenos.

Salvo algunas excepciones, la mayoría de los autores dan una explicación causal a la producción de cartílago. Asada, Fujinami y la escuela de Kaufmann, dicen que su aparición está en relación con la especie animal que se estudia; lo que en cierto sentido corrobora del Torto, según -- el cuál la aparición del cartílago depende del lugar en el que se produce la fractura y la edad del animal. Brookes afirma que el cartílago aparece con mayor frecuencia en el adulto, donde el blastema vascular tiene -- una menor capacidad proliferativa que en el niño, en el cuál y según del

Torto, por el contrario es más frecuente el cartílago.

Para Lexer ( 316 ) 1922, Mittelstieler ( 334 ) 1923, Ham ( 277 ) 1930, etc., tiene un origen vascular, y la presencia de cartílago en el callo se debe a la existencia de movimientos anormales, a nivel del foco de fractura, que rompen los brotes vasculares originando una isquemia regional que lleva a la producción de cartílago.

Girgis y Pritchard ( 273 ) en 1958, al eliminar los factores mecánicos que inciden sobre la evolución del callo empleando la calota craneal como sitio de fractura, encuentran que la isquemia es el factor preponderante en la aparición del cartílago, aunque con su modelo no pueden descartar el papel de los influjos mecánicos en su origen. Según Pritchard y Brookes, existe una relación entre la velocidad de proliferación celular y la de penetración de los vasos.

Yamagishi y Yoshimura ( 410 ) hallan un exceso de cartílago en los callos sometidos a una presión exagerada, lo que siguiendo a Partsch y Billich interpretan como consecuencia de la isquemia, que se origina en el tejido de granulación por la hiperpresión. Pauwels (475-77) que considera el cartílago de causa mecánica, afirma que la gran proliferación celular del callo ahoga los vasos neoformados, determinando así una isquemia secundaria que contribuye a la diferenciación cartilaginosa.

Krompecher y Hadhazy, y Knöfler ( 34,305 ) consideran en sus estudios experimentales, que la compresión es el factor principal en la producción de cartílago y dicen que, bajo compresión, su aparición es más rápida allí donde el aporte nutricional es peor.

Por último reseñamos los trabajos de Bassett y su escuela (219-21)- quienes sometiendo células osteoprogenitoras a diferentes condiciones experimentales, indican que tanto los factores mecánicos como las variaciones en la saturación de oxígeno, influyen en la diferenciación celular. -

La compresión sobre el cultivo unida a una atmósfera pobre en oxígeno, de termina la aparición "in vitro" de condroblastos. Estos autores observaron además, que la forma del explante determina la morfología de sus célu las.

Los datos que hemos descrito nos llevan al problema de la diferenciación y sus determinantes, como la movilidad celular y las interacciones entre células vecinas, todos estos procesos son estudiados hoy por la embriología y en los que no entramos (294,429)

Cuando la saturación de oxígeno es del 20%, sólo se produce según -- Basset un tejido cartilaginoso con gran metacromasia y disminución de -- las fibras colágenas ( 221 ). Si la saturación de oxígeno disminuye al 5% se produce sólo una proliferación de fibroblastos. Con una saturación del 30% se obtiene una osteogénesis ideal, siendo la condrogénesis máxima con una saturación entre el 20 y el 65% , a partir de la cuál se produce una condrolisis que se asocia a una osteoclasia franca al llegar al 95% -- de saturación de oxígeno.

Sea cual sea la presión parcial de oxígeno, Show afirma que en el -- centro del cultivo siempre aparece cartílago por la poca difusibilidad de aquél en los tejidos.

Stern, Goldhaber y Glimcher ( 380,386 ) estudiando el metabolismo de la hidroxiprolina en cultivos de tejido óseo, consideran que con una -- saturación del 50% de oxígeno, hay un equilibrio entre la formación y la destrucción ósea, en tanto que con una saturación menor, prevalece la forma ción sobre la destrucción.

Prasard y Reynolds ( 356 ) señalan que además del oxígeno, el -- aporte nutricio es importante, ya que, es necesaria una concentración míni ma de glucosa, por debajo de la cuál no se produce ni siquiera la diferenciación celular. Markley ha observado que en anoxia hay un acúmulo lo

cal de ácido láctico y una disminución de la síntesis proteica de la matriz ósea del callo que, además, es más débil y presenta una mayor pro - porción de hueso trabecular y tejido medular que en parte puede ser una respuesta a la anoxia. (323)

Los trabajos de Silver, Brighton, Penttinen, y Niinikoski (335,351, 342-43) sobre la saturación de oxígeno en los tejidos de reparación, han mostrado que la cicatrización se hace de forma anaerobia principalmente y que la PPO cae bruscamente desde el capilar hacia la masa de células - proliferantes que se encuentran más allá. El tejido de reparación tiene un gran débito de oxígeno, que es más marcado en las zonas donde el proce so reparativo es más intenso. Cuando finaliza la cicatrización vuelven las tensiones de oxígeno a sus valores normales. Si el animal de esper i mentación respira oxígeno hiperbárico, se produce una aceleración de la regeneración tisular, en tanto que la hipoxia frena la cicatrización -- (234-35,299,313,323,350-51)

Según Penttinen y Niinikoski el  $O_2$  es imprescindible para la dife renciación celular y la síntesis del colágeno, como también afirman Krom pecher y Hadhazy, y Herndon y Chase (280,305) . Pero ya hemos señalado que la saturación óptima para la osteogénesis se encuentra por debajo - del 50%, lo que nos indica que el hueso es un tejido braditrófico.

"In vivo" las medidas de la PPO se han hecho para el cartílago, so bre todo en el de conjunción por Brighton ( 234) quién encuentra su nivel más bajo en la zona del cartílago hipertrófico y en la metáfisis, siendo el área de las células en columna la de mayor saturación de oxígeno. Pa ra Brighton, la PPO es el mecanismo de control del crecimiento y calcifi cación de la fisis. Según él, la rotura de los septos trasversales de - las celdas cartilaginosas para permitir el avance capilar, se hace al li berar de enzimas lisosómicos las células de la vertiente metafisaria, en respuesta a un aumento de la PPO en la zona por la penetración capilar.

La mineralización del cartílago en la zona de las células hipertróficas sería para Hunt una respuesta a la hipoxia local, ya que las mitocondrias no mantienen en anoxia el gradiente metabólico necesario para acumular el Ca en su interior, que pasaría así al exterior calcificando el tejido. Calcificación que, según Bentley, determina la muerte de las células cartilaginosas al quedar aisladas por el calcio. Los trabajos de Holtrop (225) y Mc Namee (308B) indican, por el contrario, que las células cartilaginosas hipertróficas son células muy activas, que con un aumento de la saturación de oxígeno pueden transformarse en osteoblastos, como parecen corroborar, en parte, los trabajos de Urist (402) 1965.

Brighton y Krebs (235) 1972, al estudiar la PPO en el callo, encuentran una menor saturación que en la diáfisis normal, tanto en la zona de cartílago como en la zona de hueso trabecular, lo que concuerda con los datos de Gudmunson y Semb (274) de un predominio de enzimas del metabolismo anaerobio a nivel del callo.

Para Silver hay en el callo un desequilibrio entre el número de capilares y el número de células, que incrementa el débito de  $O_2$  del tejido. Según Krebs, los valores de saturación de oxígeno no vuelven a sus valores normales en el hueso fracturado hasta que se repermeabiliza el canal medular, de forma que, en el callo, la PPO permanece estacionaria hasta el 30 día aumentando desde ese momento rápidamente hasta el 35, a partir del cuál vuelven sus valores a la normalidad.

Niinikoski y cols. (343) encuentran en fracturas una disminución, entre el 30 y el 57 día, de la PPO que vuelve lentamente a la normalidad alcanzándola al 90 día. Los animales de experimentación que fueron sometidos a un régimen de oxígeno hiperbárico, mostraron un aumento de la PPO a nivel del callo, que se desarrolló y calcificó antes que en los animales control. Por otro lado, la presión parcial de  $CO_2$  tiene una evolución inversa del foco de fractura.



Penttinen dice que las zonas cartilaginosas del callo son más anaerobias que el hueso trabecular, y considera que la hipoxia influye más sobre la síntesis de la matriz que sobre la diferenciación celular.

En conclusión podemos considerar que el callo, como cualquier otra cicatriz, muestra un débito de oxígeno por la desproporción existente entre el número de células en relación al de capilares. Hipoxia que se manifiesta también a nivel del hueso trabecular, cuya aparición directa sabemos que tiene lugar sólo en torno a los capilares. En los puntos de anoxia franca aparece cartílago, su diferenciación está, además, favorecida por los factores mecánicos que, por un lado destruyen los vasos neoformados y, por otro, según Krompecher, junto a la anoxia hacen que el metabolismo de los carbohidratos en anaerobiosis quede interrumpido a nivel de los metabolitos propios del cartílago, y la célula no sea capaz de sintetizar colágeno en las proporciones necesarias para la osteogénesis.

#### Factores mecánicos .-

Pasamos ahora a estudiar los factores mecánicos que influyen sobre la evolución del callo y determinan la aparición del cartílago. Desde -- los trabajos de Wolff y Roux a finales de siglo pasado, se han debatido -- los autores en torno a la influencia de los factores mecánicos sobre la -- estructura ósea, que ellos postularon era dependiente de los esfuerzos a -- que se veía sometido el esqueleto.

Si Wolff y Roux afirmaban que la presión continua era la responsable de la osteogénesis, y la presión intermitente o la asociación de presión y fuerza tangencial la causa de la aparición de cartílago. La tensión -- era para estos autores el origen de la diferenciación conjuntiva. Pero -- W. Müller en 1924, siguiendo a Bruns y, más firmemente Leriche y Policard

en 1934 y 1936, llegaron a la conclusión que sólo en las zonas en reposo funcional se producía una osteogenesis angiógica directa o primaria como dice Krompecher. Por el contrario, la presión continua o intermitente -- llevaría a la aparición de cartílago. La tensión, como afirmaban ya los autores clásicos, originaría primero un tejido conjuntivo, susceptible -- posteriormente a osificarse. A esta osteogenesis la denominó Krompecher secundaria al precisar un tejido previo, cartílago o conjuntivo, que se osificaría posteriormente.

Para nosotros tiene interés conocer la acción de los estímulos me cánicos sobre el devenir del callo. Dannis en 1948/49 (250 ) fue el -- primero en hablar de curación " per primam o soudure autogene" de las -- fracturas, comparándola al cierre por primera intención de las heridas -- cutáneas, lo que corresponde a la osteogénesis primaria de Krompecher. -- Este tipo de cicatrización ósea fue observado por Dannis en aquellas -- fracturas tratadas por métodos quirúrgicos, con una reducción e inmovi\_ lización perfecta que determinaban la ausencia de callo perióstico en el proceso de curación de la fractura así tratada.

Las placas de osteosíntesis por él desarrolladas y la introducción en 1939 del clavo endomedular por Küntcher han variado el concepto del -- callo óseo y han determinado el estudio del mismo en estas condiciones -- particulares.

Eggers (263-4) demostró que para lograr una osteogénesis primaria del callo los extremos fracturarios debían permanecer inmóviles y en -- contacto, hasta el punto que Key y Reynolds ( 366 ) encontraban que -- la fijación rígida era el factor más importante, pudiendo demostrar expe rimentalmente que si se mantiene a lo largo de todo el proceso reparador la estabilidad de la fractura, los extremos necróticos de los fragmentos no se reabsorben, como mantenía clásicamente Böhler, sino que sirven de guía y se repermeabilizan con gran rapidez por vasos procedentes de la -- medular. Olerud ( 344 ) ha demostrado en el perro, que un capilar óseo

se regenera a una velocidad de 50 a 100 micras/día. Key y Reynolds pu  
diron observar en sus estudios, que el trazo de fractura se rellenaba desde  
la cavidad medular y región periostal, por un tejido de granulación que -  
se osificaba primariamente. Cuando el tejido medular no estaba muy lesio  
nado, asumía el papel principal en el desarrollo del callo.

Friedenberg ( 269 ) en 1952 sometiendo los trazos de fractura a una  
compresión axial, superior a la contractura muscular tónica que se produce  
en torno a una fractura, obtenía una soldadura más rápida con muy poco  
callo externo y un callo endostal exuberante de carácter fundamental -  
mente angiόgeno.

Clark y Hopes ( 244 ) al igual que Eggers, pero en mandíbulas, ob  
teñían con la fijación rígida de los fragmentos, una soldadura angiόgena,  
que era sustituida por una osificación secundaria cuando la estabilidad -  
de los fragmentos no era absoluta o existía un espacio entre los mismos.

Para Monticelli, Matzen, Lindholm, Judet, etc. ( 291, 335, 318 A )  
la movilidad de los extremos fracturarios es perjudicial al romper los -  
capilares neoformados en torno al callo y determinar así la aparición de  
cartílagos.

Los trabajos de Yamagishi y Yoshimura ( 410 ), de Pizzetti y cols. -  
( 354 ) y de Palacios a imitación, intentan diferenciar claramente cada -  
uno de los factores mecánicos que intervienen en la osteogénesis repara  
dora, sometiendo el trazo de fractura a distracción, compresión tónica, com  
presión intermitente, etc., encontrando siempre que la diastasis, como ya  
habíamos señalado, lleva a la aparición de un tejido fibroso. Yamagishi  
y Yoshimura encuentran que en condiciones biomecánicas neutras, se produce  
una osificación angiόgena primaria, cuyo remodelamiento es también muy  
precoz. Por el contrario, los casos en que la fractura está sometida a -  
compresión, tiene lugar la formación de cartílagos que sufre una osifica -  
ción encondral posterior, y determina una evolución más dilatada del callo.

Pizzetti, Silinquinini, Pavetto y del Poli, en un trabajo muy exhaustivo, indican que el mero contacto entre los fragmentos fracturarios origina un callo mixto que se hace endostal puro en los casos sometidos a -- compresión tónica. Para ellos, al igual que para Key y Friedenberg, juega el callo medular un papel fundamental en la consolidación ósea. (213)

Schenk, Willeneger, Müller (338,352,361) desarrollaron un sistema de osteosíntesis de compresión, el AO, con el fin de obtener la curación "per primam" preconizada por Dannis y Lambotte. Con su sistema se desarrolla una presión de 8 a 10 Kg/cm<sup>2</sup> a nivel del trazo de fractura, que es suficiente para obtener un contacto perfecto con un espacio menor a 7 micras entre los fragmentos, al menos en la zona inmediatamente por debajo de la placa. En estas condiciones ideales de síntesis difícilmente reproducibles en la clínica, observan un fenómeno que sólo se había descrito -- en el remodelado del hueso cortical adulto idemne . A partir de los vasos de los canales de Havers que quedan viables tras la fractura y que reciben su flujo desde la medular, poco dañada en los estudios de estos autores, se produce una neoformación capilar que, precedida por un grupo de osteoclastos, perforan el hueso cortical labrando túneles que cruzan la línea de osteotomía y en los cuales se desarrollan, a partir de las células mesenquimales perivasculares, nuevas osteonas paralelas a la cortical. Según Mueller ( 338) se completa de esta forma la soldadura ósea en seis semanas, aunque es posible apreciar en los estudios radiográficos la línea de fractura mucho tiempo después, por lo que recomienda mantener el material de osteosíntesis en la clínica humana, al menos durante 18 meses.

Olerud y Danckwardt-Lilleström (344,346) 1968, afirman que el área de hueso avascular necrótico disminuye con el paso del tiempo por la rápida proliferación vascular antes señalada. Las áreas de contacto perfecto entre los fragmentos, según Olerud, no son tan frecuentes como afirman -- los autores suizos, y existen zonas desvascularizadas que bajo la presión de la osteosíntesis se reabsorben, perdiendo así el contacto entre ellas lo cual condiciona una disminución de la presión aplicada y de la estabi-

lidad de la osteosíntesis. Reynolds ( 366 ) concuerda con estos datos y considera ésta, la causa del fracaso de algunas osteosíntesis AO.

Müeller ( 338 ), etc., señala que la aplicación de una presión excesiva determina una isquemia cortical con desaparición de la osteogénesis intracortical descrita, que es sustituida por un callo medular.

En el punto opuesto a la placa, el contacto entre los fragmentos - no es tan perfecto, hay un mayor espacio entre las corticales que es invadido por capilares de origen medular y periostal. Aunque Anderson y - Rhinelanders afirman que hay un predominio medular, Olerud señala que es indiferente y que ambas zonas contribuyen de la misma forma a la penetración capilar, que se anastomosan entre sí y tardiamente con los capilares corticales dando lugar a una osteogénesis angiógena. Las osteonas - así formadas toman una orientación perpendicular al eje del hueso y tienen, según Olerud, un anclaje débil en las corticales vecinas, con lo -- cual no son susceptibles de resistir las sollicitaciones mecánicas normales. Olerud señala que para que la "restitutio ad integrum" sea completa, es preciso que el colágeno depositado tenga una orientación paralela a la cortical y para ello es preciso que se produzca un remodelado del - callo, proceso que exige mucho tiempo para completarse. (214,344,346)

Cuando disminuye claramente la estabilidad de la osteosíntesis como sucede con frecuencia en la clínica y que, Dankwardt-Lilleström y Olerud han reproducido experimentalmente introduciendo un tercer fragmento en el montaje, tiene lugar la aparición de callo periostal y de cartílago, cuya presencia está en relación inversa a la estabilidad de la fractura.

Schenk ( 352 ) y posteriormente otros autores, observaron que la zona cortical subyacente a la placa de osteosíntesis presenta un remodelado que alcanza el 60% de sus osteonas y que explicaría el fenómeno descrito por Müller, Olerud, Lorenzi, Küntscher, etc., de la menor resistencia

cia de esa cortical a las solicitudes mecánicas, con refractura de las mismas tras la extirpación del material de osteosíntesis. Uthoff, Coutts y Harris, Tonino y cols., Mittelmeier ( 247,257,392,401 ) se han ocupado de este proceso que radiológicamente se caracteriza por una zona de osteoporosis circunscrita bajo la placa. En los estudios histológicos aparece como zona de mayor remodelado. Los túneles vasculares labrados se rellenan solo parcilamente de hueso determinando así una transformación esponjosa de la cortical. Junto a ello se ha descrito por Strömberg y Mittelmeir un ensanchamiento del canal medular. Todos los autores señalados consideran la diferencia en el módulo de elasticidad del hueso y de la placa como el origen de estos fenómenos. (257,387,392)

Hemos de considerar ahora las condiciones mecánicas y el modo de curación de las fracturas en los casos de enclavamiento endomedular. Küntscher afirma que al ocupar el clavo ajustadamente la cavidad medular, absorbe todas las fuerzas que actúan sobre el hueso, lo que le permite al callo desarrollarse en condiciones de reposo funcional completo. El callo así - logrado presentaría una osificación angiόgena primaria, y para Küntscher - el callo periostal exuberante, que aparece en sus trabajos experimentales ( 310), sería debido a la fuerte estimulación química producida por la presencia del clavo en la cavidad medular.

Los trabajos de Trueta y Cavadias ( 396 ) mostraron que tras la introducción del clavo, los 2/3 internos de la cortical quedaban sin aporte nutricional por destrucción de la circulación medular, y sólo si el clavo era capaz de mantener la estabilidad de la fractura, se desarrollaba normalmente el proceso de curación. En sus estudios el 1/3 externo de la cortical, quedaba perfectamente vascularizado a costa del periostio. Posteriormente a Trueta, Maurer, etc., ( 29,330,412 ), están de acuerdo que tras el fresasado de la cavidad medular una osteosíntesis estable con un clavo ajustado, produce como regla un callo angiόgeno primario.

En lo que no están todos los autores de acuerdo, es en la respuesta

vascular al enclavamiento. Zuckman y Maurer ( 330 ) fueron los primeros en demostrar el paso de fragmentos de tejido medular a través de los vasos corticales a la región subperiostal, originando el llamado medulohematoma. Danckwardt-Lilleström ( 249 ) 1969, demostró experimentalmente que el paso de contenido medular a los vasos corticales y a la región subperiostal, -- disminuía mucho si se aspiraba previamente la cavidad medular. Por el contrario, si se desarrolla una hiperpresión en el momento de introducir el clavo, hay una embolización de tejido medular, que origina zonas de necrosis cortical muy extendidas como consecuencia de la obstrucción de los conductos de Havers, y una reacción periostal exuberante. En los casos en - que se aspira previamente la medular, Danckwardt-Lilleström demuestra que la circulación cortical se suple a partir del periostio y las metáfisis. - En estas condiciones tiene el callo la misma evolución que en las osteosíntesis estables con placa de compresión, como hemos descrito más arriba.

Rhineland ( 369 ) 1975, afirma que en el perro sólo aparecen vasos periostales permeables en las zonas de inserción muscular, como la cresta áspera del fémur. Vasos que son capaces de suplir el aporte vascular de - la cortical al destruirse la circulación medular; en consecuencia, todas - las áreas corticales exentas de inserciones musculares, se necrosan tras - la introducción del clavo, no reapareciendo su vascularización hasta que - se ha regenerado la circulación medular. (366,371,405)

Tras estas descripciones tiene interés considerar el proceso de remodelado óseo cortical. Dhem en 1965 y Lacroix en 1971 ( 246,256 ) señalan que el mismo está producido por un frente de osteoclastos que perforan el hueso cortical. Este frente de osteoclastos se aprecia mejor, según dichos autores, en los cortes longitudinales, y su vértice forma en los cortes -- transversales lo que se conoce como lagunas de Howship. En el hueso cortical adulto los túneles así labrados siguen habitualmente el eje mayor de - la cortical según Dhem.

Inmediatamente por detrás del frente de osteoclastos avanza un brote

capilar rodeado por células mesenquimales indiferenciadas que van originando osteoblastos dispuestos en capas sucesivas sobre las paredes del túnel, al cuál cierran, dando lugar a la aparición de una nueva osteona. Las líneas cementantes marcan el contorno externo del túnel horadado. Según -- Dhem, el túnel así formado tarda 16 veces más en rellenarse que en perforarse. Lacroix, afirma que se depositan de 0,5 a 1,5 micras al día a lo largo del canal durante las primeras fases del cierre que, posteriormente, se hace de forma mucho más lenta.

Frost (63,66) afirma que en primer lugar se activan los osteoclastos que posteriormente dan lugar a una parte de los osteoblastos, los cuales -- presentan ondas de actividad de unos 14 días de duración. En cada fase -- tiene lugar la síntesis de la matriz orgánica, que envuelve a estas células, y su mineralización.

Rasmussen y Bordier ( 45 ), basándose en datos previos de Frost, -- Young, Owen, etc., (32,40,53,63) afirman que en el hueso cortical adulto -- idemne, el remodelado por estímulo de la PTH o de la vitamina D, se inicia siempre por una fase de destrucción osteoclástica que va seguida de un ciclo osteoformador. A nivel de la superficie periostal la primera respuesta es por el contrario la aposición ósea.

Como hipótesis se puede suponer, considerando como probados los datos previos, que la fractura es también un estímulo para la respuesta celular que toma la misma forma que el remodelado cortical por estímulos metabólicos cuando, por métodos quirúrgicos, se mantiene la estabilidad mecánica del hueso. Si esta no se obtiene en grado suficiente, se desencadena -- una proliferación celular periostal que contribuye a lograr la estabilidad de la fractura y, una vez alcanzada, comienza el proceso de remodelado que llevará a la "restitutio ad integrum" de la cortical.

Junto a las condiciones mecánicas, hemos de reseñar los estudios que se ocupan de los mediadores químicos determinantes de la transformación --



de la célula mesenquimal en osteoblasto. Estas sustancias químicas fueron postuladas por Bier, y Lacroix las denominó osteogeninas. Su existencia es aceptada por Judet, Trueta, Kuentscher, Tonna, etc.

Urist y su escuela y Friedenstein y la suya (270,404) afirman -- que la osteogenina liberada de la matriz, es fagocitada por unas células que inducen, a través de contactos intercelulares, la transformación específica de las células vecinas, en este caso en osteoblastos. Según los trabajos de Urist y Bühring (239) parece que se trata de una macromolécula de tipo MPS.

Heyple, Herndon y Chase (280, 281) fueron capaces de inducir, a partir de osteosarcomas, hueso a través de membranas de milipore en cultivos de fibroblastos, lo que se debía al paso de prolongaciones celulares a través de dichas membranas.

Chalmers y Rush (243) dicen que junto a este sistema sustancia inductora-célula inductora-célula inducida, existen inhibidores con los que hay que contar. Por tanto, la inducción resultaría del equilibrio entre inhibidores e inductores.

Los trabajos de Warthiowara y Saxen (85) 1974, con epitelios renales, indican que la inducción se hace claramente a través de los contactos celulares que hemos descrito anteriormente. Friedenstein (212) 1972 estudiando sistemas de inducción "in vitro" describe la existencia de vacuolas en las células inductoras, que serían la base morfológica del factor inductor. Todos estos datos tienen más aplicación en el estudio de los injertos óseos cuyas revisiones encontramos en Elves, Bonfiglio, -- Young, Siffert, Boyne, Ray, etc. (222,232-3,265-6,322,339,355,360,362B,372,381-2,411).

concepto de inducción iniciado por Speeman, ha sufrido en el tiempo varios avatares. El estado actual de la cuestión aparece en los trabajos de Bellairs, Wolpert (429,497) Young considera como inducción una -

especialización celular en respuesta a un cambio en el micromedio, y para que suceda, exige la presencia de un contacto íntimo entre las células y el mantenimiento de las especializaciones inducidas. ( 53,212,239,259,270, 285,347,402-4).

La especialización celular es un fenómeno discreto, que comprende -- la síntesis selectiva de un grupo de proteínas. La especialización es -- controlada por su interacción con el micromedio. Hay que considerar, por tanto, todo el complejo de factores físicos y químicos que actúan sobre -- la célula. Tomado así, la supuesta osteogenina no sería más que otro factor, aún de carácter preponderante, que actuaría como señal para la especialización celular en un medio apropiado. (429).

Hemos visto hasta aquí, que la respuesta celular es desencadenada -- por el insulto traumático, y se modula de acuerdo con la situación mecánica en la que se desarrolla, por tanto, nos interesa ahora buscar cómo -- esos factores físicos gradúan y orientan la respuesta celular.

F E N O M E N O S   E L E C T R I C O S

## FENOMENOS ELECTRICOS

En los capítulos precedentes hemos visto que en el hueso tienen lugar una serie de procesos de proliferación, emigración y diferenciación celular. Síntesis de una matriz orgánica diferente según las condiciones del medio, es decir, cartílago o hueso, y su posterior remodelado con adaptación a condiciones mecánicas diferentes, todo bajo el estricto control celular.

Los mecanismos que regulan estos procesos celulares no son claramente conocidos. Como es sabido desde antiguo, el tejido óseo es pobre en terminaciones nerviosas tanto sensitivas como motoras ( 436, 472 ) que pudieran explicar un control neurológico directo de los procesos celulares, como tiene lugar a nivel de músculo. ( 422 )

Los fenómenos de inducción, cuya existencia describiera Speeman ( 497 ) son susceptibles, como mucho, de explicar el desencadenamiento de la respuesta celular ante un estímulo y su modulación hacia la osteogénesis, pero no su regulación, y desde luego no sirve para explicar las modulaciones tisulares posteriores.

Aunque desde Galvani en 1772 se conoce la existencia de electricidad en el organismo, su estudio sistemático es posterior. Frente a los fenómenos eléctricos típicos del sistema nervioso, cuyo paradigma es el potencial de acción, exponente de la reacción transmisible de un tejido especializado en la respuesta a estímulos, es decir, excitable, y cuyo estudio se sale totalmente de nuestro campo, se han descrito en: el organismo pluricelular, células, macromoléculas orgánicas y compuestos inorgánicos otra serie de actividades eléctricas, que para el organismo vivo se conocen como potenciales bioeléctricos, diferentes a los potenciales de acción antes mencionados.

Fueron los trabajos de Burr, Went y Lund los que iniciaron el estudio de estos fenómenos, en especial en las plantas, y postularon que la orientación en el espacio de las células vegetales y animales durante el crecimiento estaba sometida a procesos eléctricos. En el reino vegetal existen una serie de trabajos como los de Shatilov, Panichkin, Nesterov, etc., ( 294, 420, 456 ) que demuestran un cambio del poder germinativo de diferentes semillas cuando se las somete a potenciales eléctricos.

En el reino animal Bentrup y Lund ( 421, 494 ) modificaron el crecimiento de diversos animales inferiores sometiéndolos a campos eléctricos. Humphrey en 1959 ( 420 ) pudo hacer regresar en la rata diversos tumores malignos aplicando corrientes de poca intensidad, y Ambrose ha demostrado que el potencial superficial de las células tumorales de hígado y riñón es superior en casi el doble al de las células normales del mismo origen, lo que está posiblemente en relación con los procesos de comunicación intercelular descritos por Loewenstein (70, 71), que se alteran en las células tumorales. Por medio de microcorrientes ha sido posible también producir trombosis venosas, etc..

Al margen de todos esos datos que pueden tener interés en mostrar que los potenciales bioeléctricos están ampliamente repartidos en el reino animal y su posible importancia, nos interesa aquí estudiar su influjo en los fenómenos de regeneración tisular en el esqueleto y su existencia a nivel óseo.

Becker en 1961 ( 422 ) fue el primero en demostrar la existencia de un campo eléctrico global en el organismo, al menos en la salamandra, y su valor para la regeneración de los miembros amputados al aplicar una corriente continua sobre el muñón.

Becker demostró unas líneas equipotenciales que le permitieron establecer un mapa del campo eléctrico. Encontró unos puntos positivos sobre el neuroeje con un máximo en las zonas de mayor acúmulo celular, y unos -

puntos negativos máximos en los extremos de los miembros y la cola, es decir, al final de los grandes troncos nerviosos. Observó que estos potenciales desaparecían al seccionar los nervios y postuló la existencia de un flujo de potenciales bioeléctricos de origen neuronal central, sin establecer ningún tipo de correspondencia anatómica o fisiológica mayor. Afirma que se trata de un sistema de transmisión perfectamente organizado como mecanismo de información y control primitivo, y siguiendo los primeros datos de Singer, quién indicó que el proceso de regeneración tisular guarda relación con la masa de tejido nervioso presente en la zona a regenerar, analiza la relación entre la regeneración de miembros en la salamandra, los fenómenos eléctricos y las modificaciones del sistema nervioso. Inmediatamente tras la amputación se produce a nivel de la zona una inversión de la polaridad, que Becker relaciona con el potencial de lesión; disminuye o incluso desaparece el potencial registrado tras la sección de los troncos nerviosos y muestra relación con la anestesia. Durante el proceso de regeneración del miembro el potencial positivo va disminuyendo de manera más o menos constante, presentando un nuevo máximo de menor intensidad que el anterior, en torno al 5º día tras la amputación, para hacerse después rápidamente negativo, con un máximo entre el 8 y el 15 día. El valor negativo registrado es muy superior al fisiológico. Al establecer una relación entre los fenómenos eléctricos y los histológicos, el potencial positivo aparece durante la fase de proliferación celular y la formación de blastema, en tanto que la fase negativa aparece con los procesos de diferenciación celular.

Según Becker 1961 ( 422 ), inmediatamente después de una fractura se produce, igual que tras la amputación, una inversión de la polaridad, que se negativiza de nuevo en torno al décimo día, con un máximo hacia los quince días. En todos los casos los potenciales registrados son de menor intensidad que tras la amputación. El potencial de lesión sería el origen de los potenciales detectados a nivel de la fractura, según Becker.

Fridenberg y Brighton 1966 ( 450 ) registraron en conejos y per-

sonas, sobre la piel, periostio y hueso, la existencia de diferencias de potencial y encuentran que tanto en el animal en crecimiento como en el adulto, la epífisis de los huesos largos es positiva en relación a la metáfisis. El punto de negatividad máxima se localizaba a unos 3 cm. de la línea epifisaria, y al desplazar el electrodo de medida distalmente sobre la diáfisis, el potencial tiende a hacerse positivo, para en el adulto, en ocasiones, negativizarse de nuevo a nivel del complejo epífiso-metafisario distal. Estos potenciales son similares sobre el periostio y sobre el hueso cortical expuesto, pero los registros periostales son de menor magnitud. Al provocar una fractura a nivel de la tibia o del fémur, observaron que se hacía negativa toda la diáfisis con un 2º vértice negativo a nivel del foco de fractura, con un valor máximo de -24,2 mV, y un valor medio de -8 mV, en mediciones sobre la piel.

La negatividad permanecía hasta la curación histológica de la fractura y solo cierto tiempo después se producía una vuelta al patrón eléctrico normal. El huseo controlateral usado como control, mantuvo constantes sus mediciones a lo largo del experimento.

Estos datos confirman que las zonas de regeneración y crecimiento tisular son negativas. Al contrario que Becker, Friedenberg y Brighton consideran que los potenciales registrados pueden ser debidos a diferencias en las concentraciones iónicas en los diversos puntos medidos y dan menor importancia al sistema nervioso en su génesis. Por último consideran que el hueso largo en sí, puede tomarse como un conductor al estar formado por un cilindro hueco en cuyo interior se desplazan cargas, que en este caso son los corpúsculos sanguíneos. En apoyo del factor vascular como génesis de los potenciales registrados está el hecho de que los puntos de mayor negatividad, la metáfisis y el área fracturaria, son así mismo las zonas más ricamente vascularizadas. Esto hace necesario considerar la existencia de potenciales de flujo, de los que nos ocuparemos más adelante. Friedenberg considera que estos potenciales no tienen nada que ver con los potenciales piezoeléctricos y demás fenómenos

eléctricos relacionados con las solicitudes mecánicas del hueso.

Becker y Murray ( 426 ) 1970 trabajando en la rana, como anfibio superior que ellos equiparan en su capacidad regenerativa al hombre, midieron en la tibia los potenciales bioeléctricos que aparecen en reposo sobre el periostio, encontrando un gradiente de voltaje a lo largo del hueso con un punto negativo máximo localizado entre ambas metafisis. Al provocar una fractura los potenciales, medidos siempre sobre el periostio, mostraban una modificación que variaba en el tiempo. Inmediatamente tras la fractura los extremos de ésta se hacen negativos apareciendo en las diáfisis, a ambos lados y a 1 cm. aproximadamente de la línea de fractura, potenciales positivos creándose así un dipolo que desaparece en los días sucesivos en los que, hasta el séptimo, se mantiene la negatividad de la zona de fractura, con un máximo en torno al día cuarto, con intensidad en torno a la mitad de los valores registrados en los momentos inmediatamente posteriores a la lesión.

Cuando hacen las mediciones directamente sobre el hueso, tras retirar el periostio, medidas que hace solo de forma aguda, encuentran que los extremos fracturarios se hacen positivos en relación con las diáfisis vecinas, al contrario que los datos de Friedenber<sup>g</sup> antes señalados, y además Becker y Murray encuentran valores de intensidad menor cuando las medidas se hacen directamente sobre el hueso que si se hacen sobre el periostio.

La interpretación del origen de estos potenciales según Becker y Murray no es unitaria, ya que, los potenciales encontrados a nivel del periostio los consideran de origen nervioso y los relacionan con la inervación periostal, pues la sección de los troncos nerviosos altera los potenciales registrados. Según estos autores los potenciales generados por el tejido nervioso a ese nivel tendrían un papel de control en la diferenciación y regeneración celular.

Junto a esta fuente de potenciales bioeléctricos, señalan que la apa



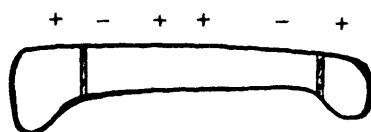
rición del dipolo está relacionada con la energía que absorbe el hueso en el momento de la fractura. El exceso de fuerza aplicada, que condicionó la lesión, queda absorbida por el tejido que la libera después y, según Becker, a través de ese dipolo, que determina un paso de corriente a través del hematoma con una intensidad entre 2 y 2000 micro-micro-A. , que sería el estímulo responsable de la proliferación celular que va a producir el callo de fractura. (479)

Athenstaed 1970 ( 418-19 ) y Digby (442- 43 ) demuestran en el hueso en reposo la existencia de potenciales bioeléctricos, y en especial el primero señala que a nivel del cartílago de crecimiento se produce una polaridad que durante el crecimiento es divergente hacia la epífisis y la diáfisis, cambiando el sentido de la polaridad en el momento que cesa el crecimiento, y demuestra un gradiente similar al descrito por Friedenberg. Athenstaed (418 ) atribuye este gradiente a la existencia de potenciales piroeléctricos, es decir, potenciales permanentes de carácter macroscópico orientados en el sentido del eje de la estructura en cuestión, que se modifican con la temperatura y la presión hidrostática. El origen de estos potenciales radica en la presencia de cargas polares en el hueso, el colágeno presenta dichas cargas y no la hidroxiapatita que tiene un centro de simetría. Una estructura polar es aquella que presenta una separación de cargas cuyo centro de gravedad no coincide, determinando así una polarización permanente de la molécula en el sentido de su eje longitudinal. En el colágeno, las cadenas laterales de aminoácidos y azúcares de ionización alternante, son las responsables de la estructuración polar del mismo. En el hueso este fenómeno piroeléctrico estaría atenuado por la capa mineral que cubre la fibra colágena.

Athenstaed no sólo describe la polarización de los huesos largos y de los cartílagos de conjunción, sino que además demuestra la existencia de una polarización en el esqueleto axial, en las meninges que se polarizan en sentido único desde el agujero occipital hasta el cono medular, --manteniéndose dicha polaridad en las cubiertas de los nervios periféricos

y con una polaridad inversa de los axones y la médula. La polarización de las envolturas nerviosas la atribuye a la disposición espacial del colágeno. Athenstaed afirma que el control de los procesos de crecimiento están en relación con estos fenómenos eléctricos y con la polarización de las estructuras por él descritos. (428,483)

Vemos, pues, que es posible a nivel del hueso, al margen de los potenciales originados por las solicitudes mecánicas, unos potenciales bioeléctricos que demuestran en los huesos largos una dirección y una oscilación en sus valores según la edad del animal y la zona del hueso, de forma que siguiendo a Athenstaed ( 419), Weigert ( 492), Friedenberga (452 ), - Digby ( 442), etc., se puede establecer el siguiente esquema:



Durante el crecimiento los valores registrados son más altos, pero su configuración se mantiene en el individuo adulto. Según Weigert, en el conejo oscilan entre  $\pm 5$  mV. Para Friedenberga en el animal en crecimiento en la tibia, las medidas sobre el periostio muestran un valor medio de  $-3,1$  mV para la metáfisis y  $+2$  mV para la porción central de la diáfisis. Con oscilaciones entre  $-1$  y  $-6,3$  mV el primero y  $+0,3$  y  $+4,5$  mV el segundo punto.

Si en los valores numéricos están de acuerdo los autores, no sucede lo mismo con la interpretación de su origen. Por un lado Becker ( 423) -- considera los troncos nerviosos como responsables de estos potenciales, ya que estos disminuyeron claramente, según dicho autor, tras la sección de los nervios y lo relaciona con el llamado flujo electrónico de los axones, fenómeno eléctrico diferente al de los potenciales transmitidos, es decir, de acción. Por otro lado dicho autor considera que estos potenciales serían, en cierto sentido, los responsables del control de la proliferación

y diferenciación celular, siguiendo a Singer quien fue el primero en asignar al sistema nervioso un papel rector en estos procesos. Datos más recientes de éste, Globus y Liversage, etc. (427, 458-59) , indican que el efecto trófico del sistema nervioso sobre los tejidos en vías de regeneración se debe más a la existencia de un transmisor químico, que a potenciales de ningún otro tipo y que es preciso un contacto relativo del tejido nervioso con el blastema en vías de regeneración. Los datos de Rose y Rose ( 485 ) 1974, en regeneración de miembros en anfibios, demuestran el mismo esquema eléctrico que el ya señalado por Becker, y afirman que es necesario para permitir la regeneración y diferenciación del miembro, pero para que este campo eléctrico se produzca, es preciso que se establezcan uniones dermoepidérmicas.

Frente a ello Athenstaed (419) , como ya señalábamos, afirma que los potenciales registrados provienen de la estructura piroeléctrica del colágeno óseo, que por su estructura polar muestra la existencia de un dipolo permanente, orientado en el eje longitudinal de la fibra colágena. Para que ésta fuera la fuente real de los potenciales derivados, el colágeno de los huesos largos en los que se ha realizado las medidas antes señaladas , tiene que mostrar una dirección longitudinal preponderante, orientación en torno a la cual existen abundantes controversias como después señalaremos, y por otro lado podría explicar el potencial registrado en los huesos intactos, pero no a las modificaciones que aparecen en el momento de la fractura y su evolución. (150,290,415,445)

Brighton y Friedenberga(432,450-54)no encuentran una explicación unitaria para el origen de los potenciales y consideran que al efectuarse las medidas sobre estructuras macroscópicas, influyen una serie de factores, como las diferencias en la concentración iónica local en el pH, y dan un papel preponderante al flujo vascular cuyas variaciones locales pueden explicar las diferencias de signo, ya que, las zonas más vascularizadas son la metáfisis y el foco fracturario, ambos puntos de polaridad negativa en todas las medidas. Digby ( 442), en una orientación cercana, considera -

que el origen de las corrientes se debe a la existencia de flujos iónicos en los tejidos. Afirma que las zonas en vías de calcificación son positivas en relación a las áreas vecinas no calcificadas, lo que demuestra no sólo en el hueso, sino además en dientes y en las paredes arteriales, en especial en aquellas que muestran lesiones arterioescleróticas. Para que estos procesos tengan lugar, el tejido en cuestión debe presentar caracteres de semiconductor, es decir, estar formado por complejos moleculares que permitan un flujo de protones o electrones a su través, en especial en presencia de agua. Según Digby a nivel del hueso. El flujo capilar arrastra iones, en especial  $H^+$  y  $OH^-$ , en un sentido, produciendo una corriente opuesta a nivel del tejido, a través del cual pasa, por la presencia en éste de grandes moléculas con enlaces de carbono simples y dobles alternantes. Aparecen así diferencias en el pH entre el comienzo y el final del asa capilar, y la alcalinidad de su extremo distal podría explicar el depósito de  $Ca^{++}$  a dicho nivel. (443)

Pero junto a los potenciales de flujo señalados, Friedenber~~g~~, lo mismo que Becker, aceptan la existencia de corrientes de lesión que se producen en el foco de fractura y pueden explicar una parte de los potenciales registrados. Becker dice, además, que una parte de los mismos que se libera a través del dipolo por él descrito, tendría su origen en el exceso de energía mecánica absorbida por el hueso en el momento de la fractura.

La existencia de los biopotenciales, así como su evolución en el tiempo tras las fracturas, con una inversión del signo de los mismos y su supuesto papel rector del callo, ha hecho concebir a una serie de autores la idea de que la aplicación de potenciales de escasa intensidad, a nivel del foco de fractura, podría acelerar el proceso de curación, así como estimular el crecimiento.

Al margen de algún experimento clásico aislado, los primeros intentos realizados fueron los de Becker 1961, al aplicar potenciales entre 2 y 3 mA al esbozo de regeneración de miembros en la salamandra. De acuerdo

do con el momento y la dirección de la corriente aplicada, obtenía un aumento del crecimiento o de la diferenciación del blastema.

Posteriormente Becker ( 427 ) 1972, obtiene la regeneración parcial de miembros en ratas jóvenes aplicando corrientes de mayor intensidad, - con lo que observa el desarrollo de un húmero completo y de los músculos correspondientes. Estos procesos regenerativos se acompañaban de fenómenos de necrosis en la zona de los electrodos.

Los intentos de estimular el crecimiento mediante potenciales eléctricos en el mamífero, comenzados por Haas (492 ) en 1963, han dado en general resultados bastante pobres. Minkin, Poulton y Hoover 1968 ( 420 473 ), aplicando una diferencia de potencial con una intensidad de -- 70  $\mu$  A a ambos lados del cartílago de conjunción, igual que Bassett, encuentran únicamente una angulación a nivel de la fisis, por retraso del crecimiento en el lado de aplicación de la corriente, y la aparición de una exóstosis a nivel del cátodo, en especial cuando éste se localiza en la metáfisis.

Friedenberg y Kohanin 1968 ( 451 ) calculan que la resistencia para el hueso cortical subperiosteal varía entre 25.000 y 200.000 Ohm, - dependiendo del grado de humedad, y por tanto los potenciales fisiológicos oscilarán entre 3 y 10  $\mu$  A, intensidad que aplican al hueso, con lo que no obtienen en ningún caso un estímulo de crecimiento, pero observan en torno al cátodo una lisis ósea más o menos extendida por necrosis por coagulación, y en torno al ánodo áreas de formación ósea que nunca eran muy marcadas. Señalan, al igual que Bassett, que la corriente suministrada al tejido decaía rápidamente en intensidad debido al incremento en resistencia que aparecía en torno a ambos electrodos.

Wilson 1970 (496 ) encuentra que la colocación de electrodos de metales diferentes , que dan lugar a un potencial electroquímico, en la región diafiso-metafisaria del fémur o tibia de conejos, producen un estí

mulo de crecimiento más efectivo que la aplicación de electrodos conectados a una batería y suministrados con una intensidad de hasta 100  $\mu$ A, - lo que en parte era debido a las grandes infecciones que se producían en estas series.

Weigert ( 492 - 95) 1972/73, no pudo estimular el crecimiento con corriente continua o alterna aplicada a través de la fisis con intensidades entre 3,6 y 15  $\mu$ A, colocando el cátodo o el ánodo en la epífisis, lo que se debería a la lesión producida en la epífisis al implantar en ella el electrodo, lesión que sería siempre mayor que el estímulo de crecimiento logrado con la corriente. En otra serie de experimentos situa ambos - electrodos en las diáfisis de animales en crecimiento, colocando unas veces el ánodo y otras el cátodo en la proximidad del cartílago de conjunción. En todos los casos, tras aplicar 35  $\mu$ A de corriente continua a lo largo de dos meses, un plazo de tiempo muy largo, obtuvo un aumento estadísticamente significativo de la longitud y el grosor del hueso estudiado, (tibias de conejos). Es el único trabajo con resultados positivos que hemos encontrado en la literatura, en lo que se refiere a estímulos de crecimiento por potenciales eléctricos.

Más frecuentemente han sido los intentos de estimulación de la osteogenesis por aplicación de microcorrientes.

Yasuda en 1955 aplicó diferentes intensidades de corriente al hueso ( 455 ) encontrando formación ósea entre 1-100  $\mu$ A, por encima de 100 - aparece preponderantemente cartílago, y más allá de 1000  $\mu$ A sólo hay destrucción ósea. Bassett ( 423) y col. encontraron en 1964 un rápido aumento de las resistencias en torno a los electrodos, lo que hace que la intensidad real suministrada oscilara entre 0,7 y 3  $\mu$ A. La reacción osteogénica máxima aparecía antes de las dos semanas.

Friedenberg, Smolenski y Brighton ( 452, 454 ) 1968, aplican diferentes intensidades a huesos intactos por introducción de electrodos en la

medular, con un sistema que permite mantener la intensidad constante a pesar del aumento de resistencia de los tejidos, los cuales producen corrientes de retorno hacia los electrodos. Con este sistema lograron minimizar la pérdida de intensidad a un 9%. Por debajo de 5  $\mu$ A no obtuvieron resultados positivos; entre 5 y 20  $\mu$ A aparecía la respuesta osteogénica máxima, que comenzaba a disminuir después, para a partir de los 50  $\mu$ A aparecer una destrucción tisular que con 100  $\mu$ A era similar en ambos electrodos. En todos los casos la osteogénesis se produjo en torno al polo negativo, que con la intensidad óptima, entre 5 y 20  $\mu$ A, aparecía rodeado de una zona de cartílago de tipo hialino, que a su vez estaba rodeado de una zona de osificación directa cuyo volumen podía oscilar entre una ligera capa ósea y un tapón que ocupaba toda la medular. Hasta los 20  $\mu$ A en torno al polo positivo observaron la presencia de tejido fibroso, que a medida que iba aumentando la intensidad era sustituido por una destrucción tisular por necrosis por coagulación.

Friedenberg, Zemsky, Pollis y Brighton ( 433,451,452 ) en 1974, -- aplicando también potenciales continuos a huesos intactos, tras la introducción del cátodo en la cavidad medular y, como en sus trabajos previos, obtienen la respuesta osteogénica máxima entre 20 y 30  $\mu$ A. La neoformación ósea es de tipo trabecular. Hay un aumento de la vascularización medular a expensas de los capilares, y hasta 20  $\mu$ A la cavidad medular mostraba una celularidad más rica. En torno al ánodo encuentran los mismos procesos de necrosis ya señalados. A lo largo del experimento, que duró 21 días, se desarrolló un aumento de la resistencia tisular, cuyo origen desconocen, con un valor medio del 33%, aunque en algunos animales aparecieron resistencias mucho mayores. Como consecuencia de ese aumento de la resistencia debieron aumentar el voltaje suministrado para mantener la intensidad. Para 20  $\mu$ A el voltaje preciso era 0,99 V al principio y 1,32 V al final del experimento.

Richez, Chamay y Bieler, y Chamay, Richez y Bieler (438,439, 484 ) 1972, aplican así mismo los potenciales en el interior de la cavidad medu

lar del húmero de conejos, pero a diferencia de los autores citados suministran una corriente pulsátil cortocircuitando los electrodos entre cada aplicación de corriente, lo que hacen basándose en que la cavidad medular actúa como un sistema capacitante y para evitar un acúmulo excesivo de electricidad en su interior debe poder descargar la misma.

Chamay y col. usan dos modelos experimentales, en el primero aplican 250  $\mu$ A durante un segundo, cortocircuitando durante 9 sg., con lo cual el tejido libera la mayor parte de la energía eléctrica acumulada. A los 9 segundos queda aún una carga de 40  $\mu$ A, que no se ha liberado totalmente al cabo de 4 minutos. En el segundo modelo la intensidad es de 50  $\mu$ A, y el período de intervalo libre es de 2 sg.

Mediante este sistema obtienen una reacción osteogénica que alcanza su máximo en torno a las 3 semanas, y lo que es más importante, aparece en torno a ambos electrodos, aunque de intensidad ligeramente menor en el ánodo. La osteogénesis aparece a partir de las células endostales por osificación conjuntiva y encondral. En ocasiones, y más en la zona del cátodo, se produce en períodos avanzados una cavitación por reabsorción del hueso neoformado.

Weigert ( 492-95 ) 1970/73, tras lograr la osteogénesis intramedular con corriente alterna, de intensidad hasta 5  $\mu$ A, aplica también intramedularmente una corriente continua con diferentes intensidades. La resistencia de los tejidos dice que varía de acuerdo al voltaje aplicado, de forma que para 1,5 V la resistencia es aproximadamente de 300 KOhm y cae a 30 KOhm con un voltaje de 2,5 V. La resistencia depende así mismo de la frecuencia de la corriente aplicada, de forma que con frecuencias elevadas, a partir de los 50 Hz, se mantiene constante en 2 KOhm. En consecuencia con esto, diseña un sistema que le permite liberar una corriente al hueso, independientemente de las variaciones de resistencia del mismo, y con una frecuencia de 0,5 sg. de paso y 0,5 sg. de pausa. De esta manera, confirma los datos antes señalados de que a las 3 semanas la os -



teogénesis es máxima, con un mayor desarrollo en torno al cátodo. En torno al cátodo hay osteogénesis entre 25 y 50  $\mu$ A con un acmé a los 35  $\mu$ A. En la región anódica la osteogénesis es máxima con 40  $\mu$ A.

Al estudiar de manera seriada en el tiempo la osteogénesis con 35 -  $\mu$ A encuentra que en primer lugar aparece un acúmulo celular en torno a ambos electrodos. En la zona del cátodo estas células depositan colágeno, en tanto que a nivel del ánodo hay un acúmulo de fibrina. Tiene lugar - después la aparición de las trabéculas, que alcanzan su máximo esplendor a los 21 días. Su crecimiento es ~~más~~ lento a nivel del ánodo.

Para el clínico tiene más importancia conocer la posibilidad de acelerar la curación de fracturas y demás soluciones de continuidad ósea por medio de corrientes eléctricas, que la respuesta ósea aislada como hemos descrito.

Bassett, Pawluk y Becker, en 1964, fueron los primeros en verificar experimentalmente dicho supuesto. Becker y Murray ( 426 ) en 1970, tras calcular los potenciales que aparecen como consecuencia de la fractura en la rana, aplicaron su equivalente a cultivos de hematíes de rana en los - que pudieron describir la transformación de estas células en otras similares a las encontradas en el callo de fractura en dichos animales. Demostraron que para que tuviera efecto, la diferencia de potencial debía aplicarse en un campo no uniforme, y sus medidas demostraron que la intensi-dad más efectiva eran 50  $\mu$ A/mm<sup>2</sup> con una caída de voltaje de 0,3 mV a lo largo del cultivo. La aplicación de las mismas intensidades en campos uniformes es incapaz de producir la desdiferenciación celular, antes descrita, que está totalmente desarrollada a las 72 horas.

Friedenberg, Roberts, Didizian y Brighton ( 452, 453 ) 1971, y Brighton, Friedenberg y Blak ( 432, 433 ) 1972 han aplicado corrientes galvánicas a osteotomías experimentales de peroné en el conejo, encontrando que la intensidad más efectiva oscilaba entre 10 y 20  $\mu$ A. Para que estas coo

corrientes continuas aceleran el callo, debía estar colocado el cátodo en el trazo de fractura, en tanto que en el ánodo era igual que se localizara en las partes blandas vecinas o a una cierta distancia en el hueso afecto. No sólo observaron así una mayor rapidez en la curación, sino que además el hueso neoformado era más resistente a los estímulos mecánicos de flexión. En los casos positivos había un mayor desarrollo del callo endostal frente al periostal, pero sin cambios cualitativos apreciables.

Lavine, Lustrin, Shamos y Moss ( 467-68,489 ) 1971, aplican a ambos lados de defectos corticales en conejos, una corriente continua entre 2,5 y 3,5  $\mu$ A, con lo que obtienen una aceleración del proceso de curación, que está totalmente desarrollado a las tres semanas.

Weigert y cols. (494-95) 1970/74, aplican a nivel de osteotomías de tibia en el conejo fijadas mediante placas de compresión A.O., diferentes tipos de corriente continua o pulsátil, con la intensidad entre 5 y 40  $\mu$ A. Estudian así mismo la colocación más conveniente de los electrodos; a ambos lados de la línea de osteotomía, cátodo en el trazo de la misma, cátodo intramedular, ánodo en la placa de osteosíntesis, alejado, o en las partes blandas. De toda esta serie de experimentos llega a la conclusión de que la intensidad más adecuada es entre 1 y 10  $\mu$ A aplicada con una frecuencia de 1 Hz, con el ánodo en la placa de osteosíntesis y el cátodo en la línea de osteotomía. Se produce también un estímulo claro de la osteogénesis con intensidades entre 1 y 20  $\mu$ A si el cátodo está en la cavidad medular, y se aplica la diferencia de potencial de manera continua. Con el primer dispositivo por encima de 10  $\mu$ A, y de 20  $\mu$ A para el segundo, no se estimula la formación del callo, que por encima de 25  $\mu$ A es inhibido claramente.

Los estudios histológicos de los callos producidos con una intensidad de 5  $\mu$ A, y un voltaje de 12 mV, con los electrodos a ambos lados de la línea de osteotomía y el cátodo en el lado contrario al de la placa para no distorsionar la imagen histológica, demuestran Weigert y Werhahn -- ( 495 ) que el callo aparece más deprisa, y que junto a la forma normal

de callo que hemos descrito al hablar de las osteosíntesis estables, aparece una mayor cantidad de callo periostal y medular, lo que ha venido en llamarse el electrocallo ( 455). Pero al margen de éste, Weigert afirma que la vascularización medular del segmento distal bajo el estímulo eléctrico es más abundante y está más desarrollada que en los controles, aunque siempre sea menor que en el fragmento proximal. Como consecuencia de esta vascularización más rica, las lagunas osteocitarias vacías por muerte celular aparecen con menos frecuencia en los huesos sometidos a estímulo eléctrico. El número de osteonas que cruzan directamente la línea de osteotomía en el punto opuesto a la placa es más abundante en el lado estimulado, en tanto que la anchura de la línea de osteotomía es mayor en el lado control por un mayor remodelamiento osteoclástico del trazo, que además está relleno por osteonas perpendiculares a la cortical, de origen medular y periostal. Por tanto las diferencias de potencial aplicadas estimularían la curación "per primam" de las corticales en los puntos opuestos a la placa de osteotomía, con un aumento de la vascularización medular y en consecuencia una menor muerte celular. En fases más tardías, Werhahn y Weigert demuestran que el remodelado avanza más rápidamente a nivel de las tibias bajo influjo eléctrico.

Bassett, Pawluk y Pilla ( 421,437 ) 1974, preconizan para el uso en personas el desarrollo de otros métodos de aplicación de corrientes, porque les parece un riesgo excesivo el introducir el electrodo en el hueso, y la osteolisis en torno al ánodo. Desarrollan un sistema que permite -- aplicar externamente un campo electromagnético que previamente habían demostrado tenía un efecto estimulador sobre la síntesis del ADN, y la -- orientación del colágeno. Para ello aplican en perros 2 tipos de campo , uno de 1 msg de duración, a 1 Hz de frecuencia, y un voltaje máximo de 2 mv/cm. con el que no obtienen resultados claramente positivos en la aceleración de la curación de fracturas del peroné. En otros suministran un -- máximo de 20 mv/cm. con una duración de 150 sg y una frecuencia de 65 Hz, con lo cual hay una aceleración en el proceso de curación, el callo es -- más resistente a las solicitudes mecánicas e, histológicamente, se apre --

cia un callo preponderantemente óseo, por osificación directa, con una -  
orientación de las trabéculas en el eje del hueso y la presencia de muy -  
escaso cartílago.

Las aplicaciones en la clínica han sido escasas, pero con buenos re -  
sultados. El primero en hacerlo fue Cieszynsky en 1963, posteriormente -  
Jorgensen, quién encuentra una aceleración del 30% en la curación de sus  
casos. (461)

Unos autores emplean campos electromagnéticos como el descrito por  
Bassett, en tanto que Weigert y Friedenberg y Brighton prefieren el uso -  
de electrodos directamente implantados en el hueso. Brighton ( 433) en -  
cuentra que para los huesos pequeños, como la clavícula, es suficiente --  
con un solo electrodo y una intensidad de 10  $\mu$  A, en tanto que para los -  
huesos largos de las extremidades es preciso aplicar hasta 4 electrodos e  
intensidades de 20  $\mu$  A. La estimulación en unos y otros casos dura 12 se -  
manas, con el miembro enyesado y siempre en pseudoartrosis establecida. -  
Por el contrario Weigert ( 494), al igual que en sus estudios experimenta -  
les, aplica los electrodos a ambos lados de la línea de osteotomía o pseu -  
doartrosis, tras fijar la misma con una placa de compresión.

Si son relativamente abundantes los estudios de aplicación de poten -  
ciales eléctricos en el animal de experimentación y en el hombre, son muy  
escasos los que se ocupan de los biopotenciales, como ya hemos señalado,  
y los que intentan desentrañar el mecanismo de acción de las corrientes -  
aplicadas a nivel del hueso.

Pero antes de entrar en su consideración, debemos revisar el otro -  
tipo de fenómenos eléctricos que tiene lugar a nivel del hueso y que están  
en relación con las deformidades que sufre el mismo bajo los estímulos me -  
cánicos que dan lugar a la aparición de los potenciales piezoeléctricos y  
formas afines, que es preferible denominar potenciales de origen mecánico  
Pt.M., por la discusión que existe en torno a la naturaleza eléctrica de

los mismos . Fenómenos que desde su descripción inicial por Yasuda se han relacionado con la ley de Wolff y las transformaciones que sufre la estructura ósea en relación con las solicitudes mecánicas, ya que, durante mucho tiempo el nexo entre ambos fenómenos ha sido totalmente desconocido.

En 1957 Fukada y Yasuda observaron la aparición de potenciales eléctricos sometiendo fragmentos de hueso a cargas cíclicas. Potenciales que relacionaron con la presencia del colágeno y no con el cristal de apatita.

En 1963 Shamos y Lavine describieron el mismo fenómeno al cargar huesos completos desecados. Aparece una diferencia de potencial en el momento de aplicar la carga con una ligera caída del potencial obtenido, que se mantiene en forma de meseta mientras dura la carga. Al retirar el estímulo mecánico surge un potencial en sentido inverso al primero. En 1964, --afirman que, piezoeléctrico, no es sólo aquel cristal que carece de centro de simetría y, en consecuencia, al ser sometido a un esfuerzo se polariza por separación de los centros de gravedad de sus cargas con aparición de un dipolo, sino que son todos aquellos cristales que bajo un estímulo mecánico producen un dipolo por separación de sus cargas de manera asimétrica. La aparición de la diferencia de potencial depende de la velocidad a la --que se comprima el cristal y el sentido del eje en que se haga, señalando que mientras permanezca aplicada la fuerza se mantendrá la separación de --cargas, produciéndose un potencial en sentido inverso en el momento de cesar el estímulo mecánico. El potencial es proporcional al esfuerzo aplicado. (455,489)

El hueso, tanto si se considera como fragmento o se toma como hueso completo, es una estructura policristalina y para que en la misma sea efectivo el potencial piezoeléctrico, debe mostrar una organización estructural que permita que la suma de los dipolos de los diferentes cristales no se compensen entre sí. (415,420,424,430,456-57,478,483,491).

Shamos y Lavine hacen una medida de las resistencias eléctricas del

hueso y encuentran valores que oscilan entre  $10^{13}$  y  $1,7 \times 10^{11}$  Ohm/cm para apatita y hueso completo, descendiendo para el colágeno óseo a  $8,0 \times 10^9$  Ohm. Pero Becker ( 483 ) ha demostrado que en el hueso hidratado la resistencia cae a  $10^{-8}$  Ohm/cm. Se considera a una sustancia como aislante cuando presenta una resistencia por encima de  $10^{14}$  Ohm/cm, en tanto que como semiconductor aquellas cuya resistencia oscila entre  $10^{-2}$  y  $10^9$  OHm/cm, de forma que en el huseo seco y a temperatura ambiente se encuentra en una situación intermedia, en tanto que el hueso hidratado entra de lleno en el área de los semiconductores.

McElhaney -1967- ( 471 ) afirma que como los cristales son estructuras tridimensionales, aparecerá campo eléctrico en cada sentido de aplicación de la fuerza. Mide entonces los potenciales que surgen al someter a compresión un fémur humano completo, y diferentes fragmentos del mismo y - de otros fémures, siempre haciendo las medidas sobre hueso desecado.

Sus medidas demostraron por un lado, que la representación gráfica - de los potenciales derivados era bifásica y simétrica, apareciendo con la carga y desapareciendo al retirar la compresión. Midiendo una serie de -- áreas del fémur intacto, observó una distribución muy variable de las áreas negativas y de las positivas, que se repetían al seccionar el hueso en rebanadas y someter cada una de ellas a una compresión pura, y aún se mantenía la polaridad al medir aisladamente, como fragmento en forma de cubo, - cada una de las áreas previas. Al estudiar histológicamente cada una de - esas zonas, observó que las que habían aparecido como negativas tenían un menor número de sistemas haversianos, con más hueso laminar circunferencial subperiostal y abundantes laminillas interosteónicas de orientación muy variada, en tanto que las zonas positivas eran mucho más ricas en sistemas - haversianos, en especial en sistemas osteónicos en desarrollo. McElhavey relaciona, pues, la aparición de los potenciales PZ con la ordenación del colágeno y sus medidas no aportan un gran apoyo a la teoría reguladora de la estructura ósea a partir de los potenciales generados por los estímulos mecánicos.

Anderson y Eriksson ( 415 ) 1968/70, demuestran que los potenciales derivados varían con el grado de hidratación de los especímenes, de forma que el colágeno seco es PZ en tanto que el húmedo, debido a la presencia del agua estructural, pierde sus propiedades PZ y los potenciales generados en él son del tipo de potenciales de flujo. Al medir los potenciales que aparecen en el hueso seco, considera que su origen es el colágeno. Al hidratar el hueso, los datos obtenidos varían y dependen del -- grado de humedad con lo que, la base de los potenciales registrados, se ría el flujo del agua en el tejido. Como el colágeno óseo no se puede hidratar totalmente por la presencia de la hidroxapatita, conserva una parte de su asimetría y, en parte, sus propiedades PZ al ser estimuladas mecánicamente.

Fukada ( 456 ) 1968, dice que en las macromoléculas como el colágeno y los MPS sometidos a esfuerzos mecánicos, los responsables de la respuesta eléctrica son los desplazamientos de los enlaces de hidrógeno, de los radicales  $\text{OH}^-$ , y la distorsión de los enlaces peptídicos, así como de los grupos polares ( $-\text{CO}-\text{O}-$ ) en las cadenas laterales.

Fukada ( 456 ) 1968, hace un desarrollo matemático completo de las relaciones mecánicas y eléctricas en los tres ejes del espacio, encontrando que en la madera el potencial eléctrico se genera en un plano perp ndicular al eje de la fuerza aplicada, cuando se hace en el sentido de las fibras y viene dada por el valor  $d_{14}$ , por el contrario sus medidas en el tendón de aquiles, demuestran que la polarización positiva máxima se obtiene aplicando la fuerza con una inclinación de  $45^\circ$  en relación al eje del tendón. Sometiendo a compresión cubos óseos en el eje del hueso, obtiene una polarización positiva en la cara distal a la aplicación de la fuerza y negativa en la proximal, en tanto que si se someten las caras laterales a carga, se produce una polarización en el sentido del eje z del hueso.

Popescu, Sgarbora, Denischi ( 478 ) 1972, basándose en estudios

de fragmentos femorales desecados, encuentran una relación clara entre la fuerza aplicada y los voltajes obtenidos dentro de los límites elásticos del hueso, postulan que éste se comporta eléctricamente por la reunión de dos sistemas, uno sólido, poroso, dieléctrico, que haría de aislante y -- que sería responsable de la respuesta PZ, y por otro lado impregnando es te sistema una solución electrolítica que haría de conductor y sería res ponsable de los potenciales de flujo. Vemos, pues, que tanto estos auto- res como Anderson, no consideran ya un origen único para los Pt.M.

Steinberg, Busenkell, Wert, Cohen, Black, Korostoff, (482) Black y Korostoff (430) y Steinberg, Busenkell, Black y Korostoff (491) 1972-1974, hacen en una primera fase medidas en huesos completos para después hacer- las sólo en especímenes corticales siempre mantenidos a temperatura y hu- medad constante, encontrando que las áreas bajo compresión aparecen nega- tivas en relación a las áreas en tensión. El voltaje medido, con un máxi- mo de 7,6 mV, muestra una relación directa con la carga aplicada, siempre dentro de los límites fisiológicos, y una relación no lineal con la fre - cuencia a la que se aplica dicha fuerza porque por encima de una frecuen- cia el incremento en voltaje es mínimo. Afirman que mientras se mantiene aplicada la fuerza hay una caída discreta del potencial que después se -- mantiene en forma de meseta todo el tiempo que dura el estímulo, y que la altura de esa meseta es proporcional a la fuerza aplicada. Por otro lado, al contrario que Bassett y Becker (423) y que Shamos y Lavine, interpre - tan la caída inicial del voltaje como debida a la naturaleza viscoelásti- ca del material, como propusiera Sedlin (488). No discuten estos autores el origen físico de estos potenciales ni su naturaleza exacta.

Reinish y Nordwick (483) 1975, hacen un estudio de las propiedades eléctricas del hueso de acuerdo a los estímulos mecánicos y a la humedad del espécimen, ya que, el colágeno con 45% de hidratación pierde sus poten- ciales PZ. Encuentran una relación perfecta entre el contenido en agua - del hueso y los potenciales derivados, observando que para el 100% de hu



medad, el colágeno óseo sólo presenta un contenido en agua del 12%, por su relación con el mineral, y no observan cambios con la desecación del espécimen, por el cual consideran que para todos los grados de humedad, al contrario que Anderson y Erikson, el hueso se comporta como un material perfectamente PZ, sin existir potenciales de flujo.

Marino y Becker ( 498 ) 1975, congelando los especímenes para helar el agua a  $-25^{\circ}\text{C}$ , demuestran la permanencia de los potenciales PZ perfectamente y afirman que el agua no es impedimento para el desarrollo de dichos potenciales.

Si estos autores, con ciertas variantes, aceptan que los Pt.M. derivados son de tipo PZ, existen otra serie de ellos que consideran un origen diferente.

Bassett, Becker, Bassett, Becker y Bachman (420,423-24,426), Becker y Bachman ( 425 ) y Bassett ( 220) observaron en 1962 y 1964, los datos que hemos señalado anteriormente, es decir, derivación de potenciales al someter un hueso completo o fragmentos del mismo a una fuerza, con aparición de cargas de signo negativo en las áreas de compresión. Aparición de una zona en mesetas de intensidad ligeramente inferior al apex de la curva al mantener aplicada la fuerza, con una inversión, siempre de menor magnitud, del potencial registrado, al retirar la carga aplicada. Estos datos para Bassett y col. contradicen la naturaleza PZ del hueso al que atribuyen un carácter semiconductor. Se considera como tal, aquel cuerpo a medio camino entre conductores y aislantes que puede ser de dos tipos : N cuando tiene un cierto número de electrones que pueden excitarse a la capa de conducción, y P cuando presentan una serie de huecos para electrones en su valencia de conducción. Si se reúnen dos materiales , uno de tipo P y otro de tipo N, forman un sistema PN que al someterse a estímulos mecánicos generan una diferencia de potencial que fluye en un solo sentido, el de la fuerza aplicada, es decir, que rectifican la corriente, como los diodos. Estas propiedades varían con la temperatura.

Las medidas de estos autores para el hueso han demostrado que la - conductividad no depende sólo de la temperatura sino además del grado de humedad, y tanto el colágeno como la hidroxiapatita tiene propiedades se miconductoras, siendo el primero de tipo N y el segundo de tipo P, con lo que forman un cuerpo PN.

Pero estos no son los únicos orígenes posibles de los Pt.M.; como - ya dijimos anteriormente, Athenstaedt y Lang consideran que los potencia - les tienen una base piroeléctrica. Por otro lado señalamos también la im portancia del flujo de iones de diversos tamaños, como base de las corrien - tes detectadas, y no sólo la que se produce como consecuencia del flujo -- sanguíneo, sino además por el desplazamiento de iones en un sólido, sometido a deformaciones como señalan Digby, Anderson y Erikson, así como Popescu y col.

Behari, Guja y Agarwal (428) 1974, sugieren que más que a un flujo iónico la capacidad de semiconductor se debe a un flujo electrónico y pro tónico, como demuestran los cambios en la resistencia eléctrica con la -- temperatura. El flujo protónico está en relación con la presencia de enlaces de hidrógeno.

A nivel del cartílago articular se han descrito así mismo la presen cia de Pt.M. Así Maroudas (470) 1968, hace un desarrollo teórico completo de la relación entre los potenciales de flujo que se producen en el cartí - lago sometido a presión - potenciales del orden de  $4,8$  a  $6,0 \times 10^{-4}$  V, a 1 atm de presión - con el flujo de iones, considerando al cartílago como una estructura bifásica formada por un polianion con cargas fijas unidas - a una estructura porosa y agua con electrolitos en solución. No entramos en su discusión por alejarse del tam que nos ocupa.

Lotke, Black, Richardson ( 469 ) 1974, encuentra una serie de -- potenciales al someter el cartílago a deformación, potenciales que son di ferentes en la superficie y en el interior del cartílago, y a su vez en -

las zonas pericelulares y en el interior de las lagunas. De acuerdo con - estos datos, los autores consideran que el origen de los potenciales detec - tados es múltiple, por un lado los potenciales de flujo, por otro las alte - raciones en el equilibrio de Donnan de los iones en solución, y por otro - las modificaciones en las cargas polares del colágeno y los MPS de la ma - triz sólida del cartílago.

Pasaremos ahora a considerar qué influencia tienen los fenómenos eléct - ricos registrados sobre el comportamiento óseo. Por un lado hemos obser - vado la existencia de unos potenciales en reposo, que se alteran tras la - rotura del hueso y que vuelven a la normalidad al restituirse la integri - dad anatómica. Por otro, hemos visto que este proceso de cicatrización -- puede acelerarse con la aplicación de corrientes eléctricas a su nivel, y por último hemos descrito la presencia de potenciales eléctricos relaciona - dos con los esfuerzos mecánicos a los que se somete el hueso, y que se in - terpretan como el mecanismo rector, o al menos como la señal que traduce - el estímulo mecánico a la célula que responderá en consecuencia, modifica - do la estructura ósea. (416,431,434-36,440-41,445-49,462-66,475-77,486).

Existe una serie de teorías en torno al punto donde actúan los poten - ciales; si a nivel de las células, de sus organitos o de sus productos.

A nivel celular, los estudios de Becker y Becker y Murray (422,426 ) 1970, demostraron que los hematies de rana, sometidos a diferencias de po - tencial, sufren una serie de transformaciones similares a las que se obser - van durante el desarrollo del callo, de forma que en un primer momento -- pierden la hemoglobina, para a continuación concentrarse el núcleo que se hace claramente visible y se rodea de un citoplasma claro. Esta desdife - renciación celular se mantiene "in vitro" durante un lapso de tiempo rela - tivamente largo. En ocasiones pudieron observar, aunque no de una manera consistente, que dichas células se rodeaban de una matriz.

Con métodos isotópicos e histoquímicos hallaron que tras la aplica -

ción del potencial y la extrusión de la hemoglobina, pasaba el núcleo por una fase muy intensa de síntesis de ARN, que emigraba al citoplasma donde se acumulaba y en el cuál se demostraba la existencia de gran número de ribosomas. Estos hallazgos hicieron postular a Becker y Murray que los biopotenciales producen un estímulo celular, con aumento claro de su metabolismo y de la síntesis proteica, lo que los capacita para iniciar un proceso de regeneración tisular.

Los datos de Popescu y col. ( 478 ), considerando al hueso vivo como un condensador plano, encuentran una fuerza de  $10^{-19}$  Newton de magnitud para una laguna osteocitaria colocada perpendicular al campo eléctrico al estudiar su aplicación al hueso, y que la intensidad depende del coseno del ángulo de incidencia del campo sobre la pared osteocitaria. Esto equivale a un flujo iónico de  $10^{-5}$  cm/sg. Para Popescu y col. es más importante el bloqueo de iones a nivel de la laguna osteocitaria en el sentido que la polarización impide la emigración electroforética libre de los iones, con lo cual se producen desequilibrios iónicos regionales que actuarían sobre la membrana celular de la misma forma que los procesos que desencadenan un potencial de acción. Y postulan que si esto se produce de una manera rítmica por las solicitudes mecánicas alternantes, puede modular la actividad celular osteocitaria.

Socolar y Politoff ( 70,81 ) 1970 al aplicar "in vitro" corrientes depolarizantes a células de glándula salivar, demuestran una alteración en la conductancia de las uniones entre las células, de forma que tanto con una corriente depolarizante continua como con una pulsátil, se produce una inhibición de estas zonas de comunicación intercelular, lo que se mantiene sólo durante el tiempo en que se aplican los potenciales. Estos autores afirman que el efecto se debe a una alteración en el resto de la membrana celular, que adquiere una mayor conductancia. Según Politoff los cambios en la membrana se deben a una alteración en su permeabilidad, o lo que es más probable, una liberación al citoplasma de iones previamente unidos a la membrana.

Estos datos están en relación con los trabajos de Loewenstein (70-1) 1967-1972, que se refiere siempre a tejidos epiteliales, aunque O'La<sup>gue</sup> y col. ( 74 ) 1970, han demostrado las mismas uniones en fibroblastos "in vitro" y su mantenimiento durante las mitosis celulares, Friend y Gilula - ( 62 ) hacen una revisión morfológica general de estas uniones, así como Semionescu y Palade ( 80 ) 1974, para los endotelios vasculares. Lo<sup>e</sup> - wenstein demuestra que las uniones celulares son muy sensibles a la concen - tración de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular, de forma que cuando la misma sube por encima de  $4-8 \times 10^{-5}\text{M}$ , desaparece la región de permeabilidad preferencial, se rom - pe el contacto celular y la célula se independiza de las vecinas, lo cual puede estar en relación con los datos antes señalados de Politoff de un -- cambio en la concentración de iones al someter las células a estímulos -- eléctricos. Tienen también interés los datos de Loewenstein al señalar - que la regeneración de los tejidos sólidos y la cicatrización se produce - por una liberación temporal de las células de sus uniones con las vecinas, lo que les permite emigrar y tener un mayor número de mitosis, aunque O'La<sup>gue</sup> demostrara que las uniones se mantienen a lo largo de la mitosis; esa liberación y emigración celular, según Loewenstein, cesa cuando se han uni - do los 2 blastemas proliferantes de cada uno de los bordes de la herida. - Podría postularse entonces que una diferencia de potencial aplicada a nivel del trazo de fractura podría determinar una mayor movilización celular, - con una proliferación más intensa del blastema que llevaría a una soldadura más precoz de la fractura.

Bassett, Pawluck y Pilla ( 421 ), no encuentran un aumento de las - mitosis en los casos sometidos a campos electromagnéticos.

En el sentido de la emigración de iones hay que considerar las teo - rías de Jahn ( 184 ) 1968, para quien la acción de los potenciales puede - tener dos efectos; uno sobre las células, la denominada galvanotaxis, que determina la emigración de las células mesenquimales jóvenes y de los os - teoblastos hacia el cátodo, emigración que es un carácter general de todas las células ameboides y que tiene lugar por contracción del citoplasma en

su extremo anodal por acúmulo de Ca a dicho nivel, en tanto que en la región catódica hay una inversión de las relaciones K/Ca, que determina una inhibición de la conversión sol-gel. Ambos fenómenos unidos determinan una orientación de la célula en el campo eléctrico. El segundo punto de acción de las corrientes es sobre los iones mismos, que según su PM emigran con velocidad diferente en un campo eléctrico, de forma que se produce un acúmulo de Ca y  $\text{PO}_4^-$  a nivel del cátodo.

Bassett 1971 ( 420 ) aplica potenciales a cultivos de fibroblastos con una intensidad de 1000 v/cm de forma continua, encontrando un aumento del 20% en la síntesis de ADN con un aumento de la secreción de hidroxiprolina al medio que aumenta hasta el 300% si la diferencia de potencial se aplica de forma intermitente. Según Bassett y Bozoky, esto se debe a una polarización de los electrones  $\curvearrowright$  del ADN, que determina un aumento de su síntesis, y por tanto de las mitosis celulares. Al margen de estos fenómenos a nivel del núcleo, los fibroblastos mostraron un aumento de sus mitocondrias y de sus ribosomas. Señala Bassett, que a nivel del cátodo hay un pH alcalino que favorecería el depósito mineral y colágeno, ya que a este pH, ambos son menos solubles, en tanto que a nivel del ánodo, donde se acumulan los osteoclastos, el pH encontrado es ácido.

Estos datos nos llevan a la idea de Friedenber<sup>g</sup> y Brighton ( 450 ) de que es el pH producido por los electrodos el que determina la deposición y reabsorción ósea, de forma que a nivel del cátodo junto a un pH más alcalino que favorece la mineralización, hay una menor saturación de oxígeno, que como ya hemos señalado más arriba favorece, dentro de ciertos límites, la osteo o condrogénesis. Contra ello podemos argumentar que los cambios del pH son más un índice de la actividad celular que los rectores de la misma.

Weigert afirma que la acción principal radica en el estímulo a la proliferación de las células mesenquimales indiferenciadas, como demuestran sus estudios morfológicos. Lo que no es claro, según él, es si la

acción de los estímulos eléctricos actúa directamente sobre los cromosomas como afirma Bozoky, o bien lo hace modificando el micromedio celular, bien sea alterando la concentración iónica y el pH, bien actuando sobre la membrana celular.

La posibilidad de acción de los potenciales no se limita a las células sino que se ejerce así mismo sobre la matriz orgánica y el mineral. - Uno de los puntos claros de acción es sobre la orientación de las fibras colágenas, que Knoefler y Bassett han demostrado que se orientan "in vitro" en el campo de fuerzas que actúan sobre el cultivo.

Becker, Bassett y Bachman ( 420,423 ) 1964, aplican corrientes entre 0,2 y 2 A a colágeno en solución, encontrando que al cabo de muy poco -- tiempo éste precipitaba formando una banda perpendicular al campo, adoptando una forma ligeramente curva en cuya concavidad las fibras se orientan paralelas a la banda. Este depósito desaparece al cesar el estímulo eléctrico, y se hace estable si en lugar de usar colágeno puro se añaden sales a la solución. Posteriormente Becker y Bassett ( 421 ) sugieren que una parte importante de este efecto se debe a cambios en el pH producidos por el paso de la corriente y los movimientos electroforéticos de los iones en solución. Según Bassett, los fenómenos eléctricos juegan un papel muy importante en la orientación regular de las fibras colágenas en el hueso osteónico adulto.

Hemos de considerar así mismo los MPS, que como sabemos son polianiones que presentan un gran número de cargas en su molécula, hasta 2000 según Weigert, y de acuerdo con este autor los campos eléctricos pueden variar la conformación de las moléculas del MPS y llevar a la precipitación de los mismos, con el consiguiente efecto sobre la orientación de las fibras colágenas y los procesos de mineralización.

Bassett afirma que la carga prevalente de estas macromoléculas es negativa, y por tanto electroforéticamente emigrarán hacia el cátodo. Este

autor ha demostrado que la precipitación "in vitro" de las fibrillas colágenas bajo un campo eléctrico se estabiliza también en presencia de MPS , como sucedería en presencia de iones.

Es de señalar que para Hall ( 459 ) 1971, al contrario que los autores reseñados, los potenciales eléctricos no tienen relación con la respuesta ósea a los estímulos mecánicos, y que por el contrario estos actúan directamente sobre la síntesis de los MPS, los cuales por otro lado alteran los potenciales de membrana de los condrocitos, lo que a su vez influye en el tipo y la cadencia de síntesis de estas macromoléculas.

Por último comentaremos la posible influencia de los fenómenos eléctricos sobre la fase mineral ósea. Así Jahn ( 184 ) 1968, dice que los iones tienen en un campo eléctrico una velocidad de emigración diferente, determinando a nivel del cátodo un acúmulo de Ca y de iones  $\text{PO}_4^-$  que precipitan en un PTC amorfo.

Bassett, siguiendo a Sachmanson, señala que los potenciales eléctricos al variar el pH, haciéndolo alcalino a nivel del cátodo, como hemos comentado, favorecen la precipitación del PTC a ese nivel. Y señala así mismo que los campos eléctricos son capaces de determinar la orientación y el crecimiento de los cristales.

Digby ( 442 ) da gran importancia a las variaciones locales del pH como consecuencia del flujo iónico capilar en un material poroso que es capaz, como sólido, de producir un flujo electrónico inverso, como demuestra con la técnica del azul nilo, y afirma que en el extremo más distal del capilar hay un pH alcalino, que en un medio saturado de Ca y  $\text{PO}_4^-$  determina la precipitación de los mismos y la calcificación de dichas estructuras.

Para Justus y Luft el efecto mecánico se transmite a la célula a través de las deformaciones que se producen en el cristal de apatita y



las variaciones en la solubilidad y concentración de Ca en torno a los osteocitos, en lugar de buscar un mediador eléctrico que informe a la célula de las solitudes mecánicas a las que se ve sometido el tejido. Afirman que los osteocitos son muy sensibles a las variaciones locales en la concentración de Ca. , y postulan que la base es un efecto mecanoquímico, según el cual los cristales sometidos a esfuerzos mecánicos alteran su -- reacción iónica. Y afirman que bajo compresión los cristales de apatita captan iones cálcicos haciéndose menos solubles, en tanto que al suprimir la compresión e incluso al someter el cristal a tensión, se liberan cristales cálcicos, aumentando así la solubilidad de los PTC amorfos. La respuesta iónica es proporcional al estímulo mecánico. (462).

Como resumen podemos entonces considerar que a nivel del hueso se -- detectan dos tipos de potenciales. Unos aparecen en reposo, con una morfología dependiente de los cartílagos de crecimiento y una clara modificación de su distribución con inversión de la polaridad tras la fractura -- del hueso, y una paulatina vuelta a la normalidad. Frente a estos potenciales, se describen otros en relación directa con las solitudes mecánicas a las que se ve sometido el tejido óseo, habiéndose demostrado su presencia en huesos completos, como los biopotenciales antes descritos, y -- manteniéndose en fragmentos más o menos grandes de hueso cortical; son independientes de la viabilidad celular, al contrario que los biopotencia -- les, que desaparecen rápidamente al extraer la pieza esquelética del animal.

Si sus condiciones de aparición, forma e intensidad son diferentes, también lo son las interpretaciones que se han dado de su origen. Para los biopotenciales se acepta por la mayoría de los autores un origen vascular y neurológico en tanto que los Pt.M. están en relación con las propiedades piezoeléctricas, piroeléctricas y semiconductoras de la matriz -- orgánica y del mineral óseo, así como con el flujo de cargas eléctricas a través de una base sólida, proceso que podría dar una base unitaria a ambos tipos de fenómenos eléctricos descritos.

La aplicación de microcorrientes para acelerar la curación de fracturas y pseudoartrosis ha dado un resultado positivo en manos de los autores, tanto desde el punto de vista experimental como clínico. La mayoría encuentra un valor óptimo en torno a los 20-40  $\mu$ A, en forma de corriente pulsátil y superando el aumento de resistencia que se produce normalmente en torno a los electrodos, que hacía en los primeros intentos disminuir claramente la intensidad suministrada al tejido óseo y viciaba los resultados.

Por último hemos de considerar que las opiniones de los autores en torno al mecanismo de acción de las diferencias de potencial, sea para estimular el callo de fractura, sea para explicar la respuesta celular al estímulo eléctrico como señal de la sollicitación mecánica, como quiere Bassett, están repletas de incertidumbres, no existiendo una explicación unitaria. El estímulo a la proliferación celular osteogénica o reabsortiva puede partir de una acción directa sobre el núcleo, con un doble efecto, de un lado una proliferación celular por aumento de las mitosis, y de otro un aumento de la síntesis proteica de la matriz ósea; pero junto a la acción directa sobre el núcleo se aceptan, así mismo, efectos sobre el medio celular, en el sentido de alteraciones en la polarización y permeabilidad de la membrana, cambios en el pH y en la saturación de oxígeno - que pueden orientar la actividad celular en uno u otro sentido y, por último, orientación y precipitación del colágeno y los mucopolisacáridos, - así como favorecimiento de la mineralización a través del cambio en el pH y emigración de los residuos  $\text{Ca}^+$  y  $\text{PO}_4^-$ .

HIPOTESIS DE TRABAJO

MATERIAL Y METODOS

## HIPOTESIS DE TRABAJO

En los capítulos previos hemos hecho una revisión de los datos de fisiología ósea que nos parecían necesarios para poder comprender y enfocar el trabajo que hemos realizado.

Si partimos del supuesto que el hueso es un tejido de escaso contenido neural y bajo control hormonal únicamente en lo que respecta a la homeostasis fosfocálcica del organismo, hemos de buscar otros mecanismos de control que nos puedan dar razón de los procesos reparadores, su autolimitación, así como los fenómenos de adaptación morfológica a la función demostrados en el hueso.

Siguiendo los trabajos previos de la literatura, hemos buscado en los biopotenciales un posible mecanismo rector de la evolución del callo, sin poder descartar que no fueran sino un fenómeno acompañante más de la cicatrización ósea. Hemos desechado de entrada en este planteamiento los potenciales mecánicos, al considerar que aquellos fenómenos eléctricos que están en relación con los esfuerzos del hueso íntegro, desaparecerán o se trastornarán en grado sumo al perder aquél su continuidad, y sólo es posible adjudicarles un papel en las fases tardías del remodelado del callo, sin abordar aquí las modificaciones que suceden en los casos tratados con osteosíntesis estables, en los que hemos visto se altera claramente el proceso histológico reparador y que sin base experimental, podríamos quizás considerar gobernado por los potenciales mecánicos.

Junto a ello, hemos visto que la aplicación de diferencias de potencial con una intensidad en torno a los 20-40  $\mu$ A de corriente continua, -- pulsátil, produce una estimulación en la osteogénesis, tanto cualitativa -- como cuantitativa.

En los trabajos consultados no hemos encontrado un análisis claro de

los biopotenciales demostrados, de su relación con la inervación, con el periostio, ni con su evolución en el tiempo; y por otro lado los datos - de Friedenberg y cols. y de Becker y cols. no presentan una interpreta - ción unívoca de los fenómenos eléctricos por ellos derivados.

En consecuencia hemos planteado nuestro trabajo de forma que en - una primera fase hemos analizado los biopotenciales que se demuestran so - bre el hueso intacto ( en el animal vivo anestesiado) y después las in - fluencias que sobre los posibles valores determinados tenían el perios - tio y los grandes troncos nerviosos.

En una segunda fase hemos estudiado, una vez comprobada la existen - cia de aquellos biopotenciales, su evolución en el tiempo, tras la pro - ducción de una fractura en huesos largos cuyos esquemas eléctricos cono - cíamos previamente. Análisis que se prolongó hasta la fase de remodelado óseo..

Hemos completado este estudio con el análisis histológico de los - callos de los huesos fracturados para poder establecer una posible rela - ción entre los datos eléctricos y los hallazgos histológicos.

#### Material y métodos .-

De acuerdo con los presupuestos teóricos relatados , basados en ha - llazgos de los autores que se han ocupado del tema antes de nosotros, en el estudio que vamos a desarrollar, nos hemos propuesto buscar unos fenó - menos eléctricos que fueran responsables y guías del proceso reparativo de las fracturas del callo óseo.

Para nuestro estudio, realizado en la cátedra de Fisiología espe - cial de la Facultad de Medicina Complutense de Madrid, Profesor A. Galle - go, hemos empleado ratas blancas, de raza estable whitestar, criadas en

el laboratorio, para tener una población uniforme. Las ratas se han nutrido con una alimentación standard equilibrada para cubrir todas sus necesidades, mantenidas en jaulas a temperatura ambiente de 18-22°. Las ratas eran todas adultas, para evitar las modificaciones que en el proceso reparador tiene el crecimiento, como es bien sabido ( 276 ). Se ha evitado así mismo el empleo de ratas viejas por la posible existencia de osteoporosis y alteraciones endocrinas que pudieran modificar la evolución del callo.

La distribución por sexos ha sido similar de forma que aproximadamente el 50% eran machos y el otro 50% hembras, no embarazadas. Se ha buscado esta distribución para tener un muestreo más real de la población, pero sin analizar la incidencia del sexo sobre los fenómenos eléctricos.

Si partimos del supuesto que desde un punto de vista histológico el callo muestra una evolución muy uniforme en el tiempo, con escasas variaciones individuales y sometido a patrones muy estrictos, como es aceptado por todos los autores que se han ocupado del tema y que hemos reseñado al revisar sus datos, habrá de suceder lo mismo con los potenciales eléctricos que buscamos, desde el momento que los consideramos responsables o al menos acompañantes de la evolución del callo.

De acuerdo con ello, hemos establecido las series de animales de forma que tras la producción de la fractura han sido sacrificados en períodos de tiempo variable, plazos que se han establecido a priori, en consideración a la evolución ya conocida del callo, cuyas primeras fases son las de mayor proliferación vasculo-celular. Así, hemos hecho los análisis al cabo de: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15, 21, 30 y 90 días a partir del momento de fractura. Hemos tomado los 90 días como última fecha por considerar que, en la rata, la fractura está en ese momento totalmente consolidada, y que sólo queda el fenómeno de remodelamiento óseo en actividad para restablecer completamente la continuidad de las corticales óseas y dejar el hueso en las mejores condiciones mecánicas posibles para sus sollicitaciones ha-

bituales. Este fenómeno de remodelamiento será más intenso si la curación ha tenido lugar con una deformidad residual importante del hueso afecto - ( fig. A ). Lo que ha sido la regla en este estudio, puesto que no hemos empleado ningún tipo de inmovilización del hueso roto. A los 90 días, al menos en las diáfisis de tibia, el proceso de remodelamiento está lejos de concluir.

El proceso de remodelamiento no nos interesa en este trabajo, porque corresponde a una fase posterior al proceso que estudiamos y consideramos que está en relación con los potenciales mecánicos de tipo piezoeléctrico, como hemos dicho.

Como hueso de estudio hemos elegido la tibia, por la mayor accesibilidad de su cara anterointerna, que es posible exponer sin dañar las masas musculares, que podría dar lugar a potenciales de lesión, artefactos susceptibles de enmascarar los potenciales que buscamos. En todos los casos hemos fracturado la tibia derecha, localizando el trazo de fractura a nivel de la inserción del peroné en la tibia, porque en estos roedores, el peroné no contribuye a la formación de la mortaja del astrágalo. El punto de inserción se localiza en la unión de los tercios inferior y medio de la tibia. La localización de la fractura a dicho nivel ha sido empleada con gran frecuencia por otros autores que se han ocupado del estudio de las mismas ( 245,247,340), lo que facilita la comparación entre sus resultados y los nuestros, al menos en lo que se refiere a la histología, que es la más estudiada hasta la actualidad.

Las fracturas fueron realizadas manualmente, por flexión del fragmento distal, empleando un dedo como fulcro para dicha flexión forzada. La fuerza se aplicó de manera progresiva hasta la producción de la fractura completa, pero sin un control estricto de la misma. Con ello, nos acercamos más al mecanismo real de producción de las fracturas, que si empleamos un medio mecánico con control de la fuerza aplicada; pero perdemos ligeramente en la uniformidad de la localización y morfología del trazo de fractura.

Hemos optado por la producción cerrada de las fracturas, aunque la localización y el trazo de las mismas no sea estrictamente similar en todas ellas, y hemos prescindido de todo tipo de inmovilización de las mismas. Para actuar así nos hemos basado en los siguientes puntos:

1. Experiencias previas realizadas en conejos nos han demostrado el alto riesgo de infección que presentan estos animales aun extremando las medidas de asepsia. Riesgo de infección que aumenta al aplicar los electrodos de medida sobre la superficie de estudio, dada la imposibilidad de esterilización de los mismos.
2. El empleo de material de osteosíntesis por un lado, al actuar de cuerpo extraño, incrementa, aunque sea en escasa cuantía, el riesgo de infección. Por otro lado los materiales metálicos, tanto los clavos intramedulares como los tornillos y placas, incluso los elaborados en metales austeníticos, podrían producir microcorrientes que, aun de muy escasa cuantía, modificarían las medidas que pretendemos realizar.
3. Los intentos de inmovilización externa del miembro fracturado por medio de yeso, nos han producido en dichas experiencias previas, grandes edemas y alteraciones circulatorias de los miembros, por lo que hemos renunciado al empleo de las mismas. Además consideramos que la inmovilización refleja por contractura de la musculatura que realizan los animales descargando el miembro, acerca las condiciones experimentales más al proceso de curación real que tiene lugar en los roedores en sus condiciones de vida habitual.

Hemos empleado la tibia controlateral como hueso control. En ella hemos realizado una primera medida a hueso intacto, para detectar la posible existencia de potenciales y su distribución en el espacio. La segunda



medida la hemos hecho tras producir manualmente, de la misma forma y en la misma localización que en la tibia derecha, una fractura procediendo inmediatamente después a la medida de los potenciales. Con ello analizamos las modificaciones inmediatas del potencial de reposo.

Para la primera fractura hemos anestesiado superficialmente los animales con éter, por su escasa morbilidad, tras introducirlos en una campana de vidrio.

Para la toma de medidas y fractura de la pata control, hemos anestesiado los animales por segunda vez con nembutal diluido al 1/10 administrándolo intraperitonealmente, variando la dosis según el peso de los animales de forma que, inicialmente, para las hembras la dosis fue 1,2 a 1,5 cc., y para los machos 1,5 - 2 cc. En algunos casos fue preciso a lo largo del experimento añadir anestésico, lo que se hizo en dosis de 0,2 cc. en cada ocasión. Al final de cada experimento y para sacrificar el animal, se inyectó una sobredosis de nembutal.

La toma de medidas se realizó colocando el animal sobre una base de corcho de 3 cm. de espesor ( fig. B ) a temperatura constante de 20°. Y manteniendo la humedad de la superficie expuesta mediante un regado intermitente con solución Ringer, pero evitando, en el momento de cada medida, la existencia de una capa continua de suero que uniera entre sí los electrodos produciendo un cortocircuito.

Las medidas las hemos realizado con un voltímetro digital Solartron tipo LM 1420-2.

Los electrodos empleados siguiendo los datos de Becker, Friedenberg, Weigert ( fig. C ) fueron de plata clorurada. El filamento de plata de 1 mm. de diámetro se introdujo en un tubo capilar cuyo extremo proximal se cerró con parafina tras rellenarlo con una solución de cloruro de plata . Por un extremo estaban conectados a los terminales del

aparato de medida, y por otro, el extremo sensible fue introducido en un tubo de plástico de 4 mm. de diámetro, relleno de una solución salina de agar ringer al 40%. El extremo de medida se cerró con algodón y se mantuvo constante su humedad al sumergir dichos extremos en ringer, siempre que no se efectuaban medidas.

Antes de cada registro se comprobó la estabilidad de los electrodos y su carga propia, manteniendo una diferencia de potencial constante entre los mismos dentro de un límite, que hemos tomado arbitrariamente -- como +3 y -3 mV. Si aumentaba la diferencia se cortocircuitaban los -- electrodos y a continuación se hacía pasar una corriente del orden de -- los microamperios en el sentido directo e inverso hasta obtener la lectura mínima con una corriente de 9V, introduciendo los extremos sensibles en la solución Ringer donde permanecían mientras no se efectuaban las me didas.

Hemos empleado este tipo de electrodos porque en nuestras experiencias previas el empleo de electrodos de filamento de plata exclusivamente dio mal resultado, debido a que las diferencias de potencial entre -- los mismos eran muy superiores a los parámetros medidos.

Hemos realizado una primera serie de medidas tras la incisión de -- la piel, colocando los electrodos directamente sobre el periostio y conservando las inserciones musculares, tanto en la tibia fracturada como -- en la de control, en los animales en que se realizó esta segunda medida. A continuación se escindió el periostio bajo la incisión cutánea y se -- desperiostizó la tibia completamente. Efectuando así el segundo grupo de registros.

A nivel de las patas control hemos seccionado en una serie de ellas el ciático a su salida de la escotadura ciática, y el nervio crural por -- debajo del anillo inguinal, haciendo a continuación un nuevo registro.

Por último hemos hecho otra serie de medidas sobre las tibias de -- control una vez extraídas del animal. La precocidad del registro evitó --

FIG. - D -

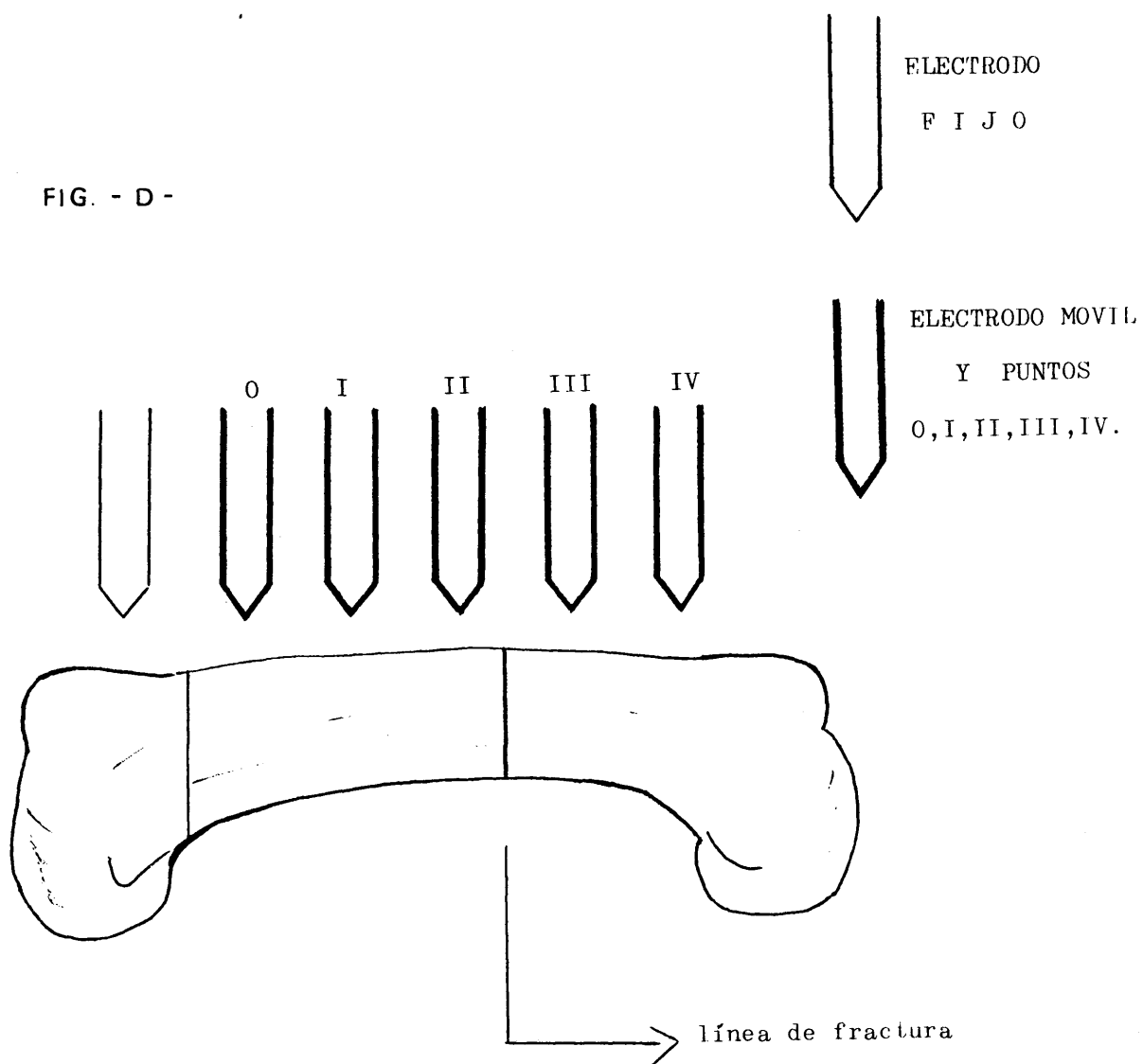
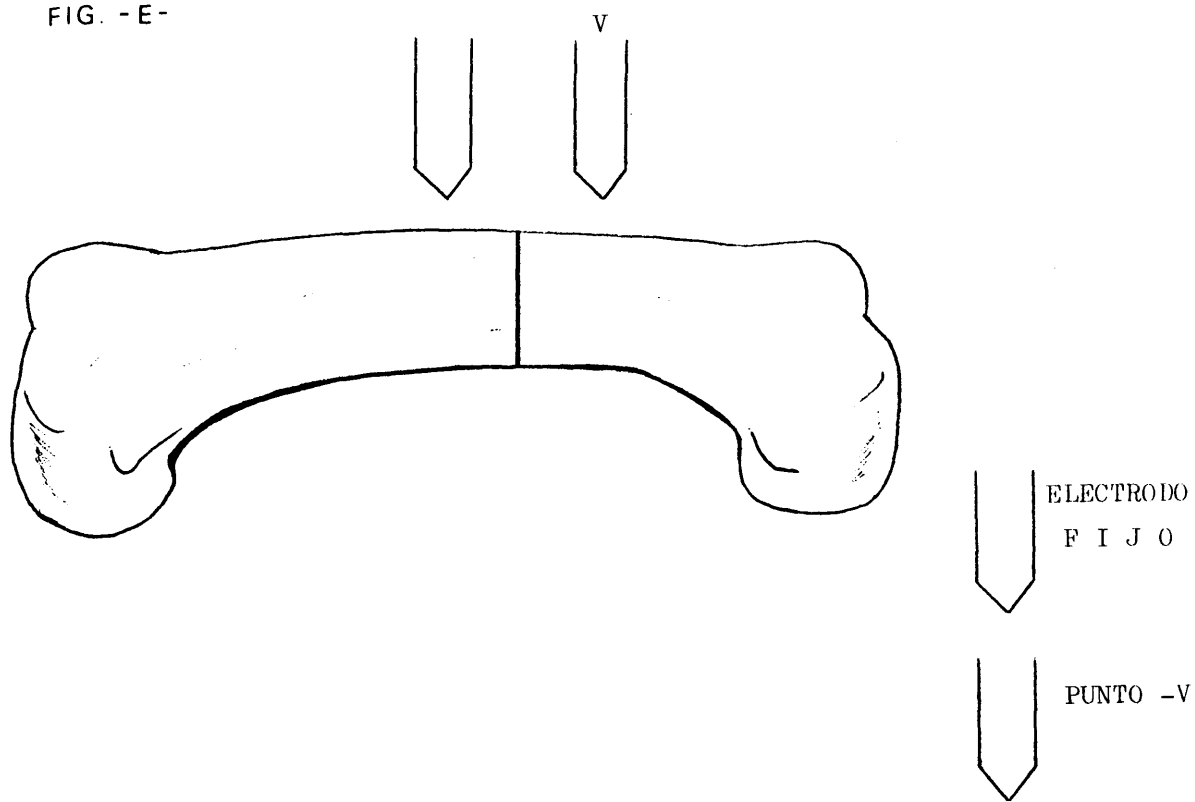


FIG. - E -



una desecación del espécimen que, por otro lado se mantuvo irrigado con - Ringer de forma intermitente, mientras duró el análisis. Los electrodos se colocaron sobre la cara anterointerna de la tibia como "in vivo".

La ubicación de los electrodos, establecida a priori, se efectuó de manera que uno permanecía fijo, el de referencia, y el otro se desplazaba a lo largo del hueso, efectuando la medida en diferentes puntos que representamos en el esquema y fig. núm. D. El electrodo de referencia se co - nectó al polo negativo del aparato de medida.

De esta forma hemos realizado sobre cada hueso, cuatro medidas de - la siguiente forma:

- a) PUNTO 0, el electrodo de registro se coloca a nivel de la metáfisis proximal, distal al lugar que ocupa el cartílago de -- conjunción en el animal en crecimiento.
- b) PUNTO 1, a nivel del tercio proximal de la diáfisis, lo que -- corresponderá a la mitad del fragmento proximal, tras la frac\_ tura, y al límite del callo perióstico, en su momento de mayor desarrollo.
- c) PUNTO 2, en la región media de la diáfisis, lo que será el - vértice del fragmento proximal tras la fractura, y que quedará englobado en el callo a medida que avanza éste y sobre el cual se efectúan las medidas de este punto.
- d) PUNTO 3, en el hueso intacto se desplaza el electrodo distal\_ mente en relación al anterior, para que tras la rotura tibial corresponda al extremo proximal del fragmento fracturario dis\_ tal.
- e) PUNTO 4, a nivel de la metáfisis tibial distal.

Antes y después de cada serie de medidas hemos comprobado las diferen  
cias de potencial interelectrodos.

En una parte de los animales empleados se realizó junto a la fractura de la tibia derecha, una fractura costal múltiple en la parrilla costal derecha, también de manera manual y bajo anestesia etérea. Las costillas así fracturadas se extrajeron del animal, una vez muerto éste, y se emplearon - para el estudio del callo.

Los parámetros numéricos recogidos, siguiendo los criterios actuales en los estudios experimentales, han sido procesados estadísticamente para - obtener una información cuantificada de los mismos y su validez.

Hemos empleado criterios estadísticos diferentes, ya que, debemos com  
parar entre sí una serie de parámetros que no es posible reunir en principio en una fórmula estadística única. Los parámetros que tenemos que conside -  
rar son los siguientes:

- 1.- La diferencia existente entre las medidas obtenidas "in vivo" y las de las tibias aisladas.
- 2.- La relación entre las medidas hechas con periostio y tras despe  
riostizar el hueso.
- 3.- La variación o identidad de las medidas en el espacio, es decir, en los diferentes puntos señalados.
- 4.- La modificación de estas medidas como consecuencia de la fractu  
ra y su variación en el tiempo.
- 5.- La combinación de estos criterios diferentes entre sí, de forma

que comparemos:

- a) las variaciones en el espacio, de acuerdo con la presencia de periostio o no
- b) las variaciones en el tiempo de acuerdo con la idemnidad - del periostio
- c) la correlación de las medidas en el espacio y en el tiempo.

6.- Por último hemos representado gráficamente dichos resultados.

De acuerdo con ello, la primera elaboración a la que han sido sometidos los datos ha sido la determinación de la media de los valores obtenidos para cada punto y momento. La desviación típica de esa media, el error típico y su coeficiente de variación.

Una serie de estadísticas está constituida por el conjunto de los valores numéricos que resultan de la observación. Una vez ordenados estos datos es posible establecer una distribución de frecuencias de los mismos, lo que permite establecer un diagrama de esos valores. Para poder establecer comparaciones entre diversos grupos se recurre a unos valores que se pueden considerar como típicos, y que se denominan parámetros típicos. El primero de ellos es la media.

La media de una distribución de frecuencias, es su media aritmética y se representa por la fórmula:

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n} \quad (1)$$

Es decir, la relación entre el número de valores y su suma.

Pero el cálculo de la media no es suficiente para caracterizar una serie porque no nos indica la distribución de los demás valores en la serie y su agrupamiento en torno a la media, siendo preciso conocer la dis-

persión de los demás valores en torno a la media. Debemos saber esta dis  
persión para comparar valores entre sí; en las series grandes se hace me\_  
diante el cálculo de la varianza.

La distancia entre un valor cualquiera del grupo y la media vendrá  
dado por:

$$x - \bar{x}$$

y para que no intervenga el signo, se recurre a lo que se conoce como el -  
cuadrado de las desviaciones:

$$(x - \bar{x})^2$$

La suma de todos ellos es la desviación cuadrática, que da una idea  
de la dispersión en torno de la media, pero para comparar series de tama-  
ño diferente entre sí, es preferible relacionarlo con el número de valores  
de la distribución, y es lo que se conoce como varianza:

$$d^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad (2)$$

Es decir, representa la media aritmética de los cuadrados de las des  
viaciones y es un índice medio de la dispersión global de la distribución.

Como es un valor elevado a una potencia, se analiza mejor la raíz --  
cuadrada de la varianza, que es homogénea con  $\bar{x}$  y que se conoce como des  
viación típica o desviación cuadrática media, que viene dada por la fórmu\_  
la:

$$d = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n}}$$

Junto a ello hemos considerado así mismo el error típico y el coefi-  
ciente de variación.

El paso siguiente será la comparación entre sí de las diferentes se-

ries, para lo cual hemos empleado el test de Student.

El test de Student se emplea cuando las muestras estudiadas son pequeñas, lo que sucede siempre que éstas tengan menos de 30 valores para cada parámetro. Entonces, la media ya no muestra una distribución normal y su determinación, y el de la desviación standard, no son muy aceptables desde un punto de vista estadístico. Cuando los valores son inferiores a 30 su curva de distribución de frecuencias es diferente de la normal, tiene la misma forma de campana que la curva de Gauss, pero es más aplanada y tanto más cuanto menor es el efectivo de valores analizados, se considera como una curva hipernormal.

Todo el problema se cifra en calcular los límites dentro de los cuales debe encontrarse el valor del parámetro normal de cualquier medida de una población, lo que se denomina el intervalo de confianza. Para su cálculo es preciso conocer primero la desviación standard de la media ó  $s_m$ , que representa la desviación típica de las medias de muestras pequeñas de una gran población,  $s_m$  se apartará menos de la media real que cada uno de los valores individuales, y está en relación con el tamaño de la muestra determinada que viene dada por:

$$s_m = \frac{S}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

En esta fórmula como no se conoce realmente S, que representa todos los valores individuales, se emplea d, es decir, la desviación típica, que es algo menor que S, por lo que se relaciona con  $n-1$ . De forma que (3) se transforma en:

$$s_m = \frac{d}{\sqrt{n-1}}$$

Volviendo a las muestras pequeñas, inferiores a 30, se puede considerar su media  $m$  diferente de la real  $M$ , su relación viene dada por  $t$  es:

$$t = \frac{m-M}{s_m} \quad (4)$$



En una distribución normal la probabilidad de hallar un valor es más débil cuanto más alejado se encuentre de la media. La curva de Gauss muestra una inflexión a partir del valor 1 d, haciéndose la probabilidad muy débil con el valor 2 d, que corresponde al 4,5% del total de los valores. Por tanto:  $(M - 2s_m) (M + 2s_m)$  incluye el 95,5% de los valores, que asciende al 99% cuando se toma 2,6 en lugar de 2, a esto se denomina también coeficiente de seguridad que para el 99% es  $(M \pm 2,6s_m)$  (5)

En los casos de muestras menores de 30, en que aplicamos la t, ésta es superior a 2, y para un coeficiente de seguridad del 95%, es  $t_{0,05}$ , y para un coeficiente del 99% es  $t_{0,01}$ , quedando la fórmula (5) modificada así:

$$M \pm t_{0,01} \cdot s_m \quad (6)$$

Los valores de t, en relación con el grado de libertad de la muestra, vienen especificados en tablas que existen publicadas.

Los cálculos estadísticos de las muestras obtenidas, se realizaron en una primera fase en la Cátedra de Fisiología Especial de la Facultad de Medicina Complutense (Prof. Dr. A. Gallego), y su elaboración definitiva en el Servicio de Informática Médica del Hospital Clínico de Madrid (Dr. C. Martín Cinto).

Por último hemos de señalar que la correlación morfológica la hemos intentado establecer de la siguiente forma:

1. Hemos extirpado las tibias, base del estudio que nos ocupa. Las hemos fotografiado para conservar una imagen macroscópica de la evolución del callo, así como de la deformidad sufrida por las tibias. Para ello hemos empleado el dispositivo Leitz de fotografía de piezas necrópsicas de la Cátedra de Anatomía Patológica (Prof. A. Bullón).

2. Las tibias y costillas conservadas en formol al 10%, en un volumen de formol x 10, el de la pieza, han sido después descalcificadas con ácido nítrico en una cubeta oscilante, incluidas en -parafina y cortadas en microtomo.

Los cortes se han teñido para la microscopía ordinaria con hematoxilina y eosina, con la técnica de Van Giesson, y con el tricrómico de Masson, según las formas habituales. Se han estudiado en un microscopio Zeiss, momocular, y las fotografías se han realizado con un aparato Canon Fl, sobre carrete Agfa Iss y Kodak Plus X-Pan de 125 ASA y 22 DIN, para blanco y negro.

No hemos hecho estudios de histoquímica a partir de piezas en fresco, ni tampoco hemos retirado material para someterlo a las técnicas de la microscopía electrónica de transmisión y rastreo.

POTENCIALES BIOELECTRICOS EN  
EL CALLO DE FRACTURA  
SU CORRELACION HISTOLOGICA

(ESTUDIO EXPERIMENTAL)

TOMO - II

S U M A R I O

---

## S U M A R I O

	página
Hallazgos eléctricos .....	192
Hallazgos morfológicos .....	234
Discusión .....	269
Conclusiones .....	298



### HALLAZGOS ELECTRICOS

Según el método antes expuesto, hemos realizado el estudio en una población de ratas adultas, de ambos sexos, con una distribución equivalente. Tras el primer trabajo realizado llegamos a la conclusión que el análisis de un animal exigía una media hora de tiempo desde el momento en que se colocaba sobre el soporte de corcho hasta la terminación de las medidas, teniendo en cuenta que había que cortar el pelo de la pata a medir, escindir la piel y tejido celular subcutáneo, evitando lesionar el periostio, identificar la epífisis proximal de la tibia, colocando en contacto con la misma, pero sin ejercer presión excesiva, el electrodo de referencia, que se fijaba en un soporte de laboratorio ( fig. E ), después, registro en los diferentes puntos antes descritos con el electrodo móvil. Al final de esta medida, comprobación del potencial interelectrodo. El paso siguiente era la denudación ósea tras retirar el periostio, sin lesionar las inserciones musculares, comprobación de nuevo del potencial propio de los electrodos y nueva toma de datos con la misma sistemática que acabamos de describir. Durante la medición, como ya hemos señalado, se conserva el grado de humedad de forma constante, por irrigación del hueso expuesto con suero salino.

Terminada la medida en el hueso fracturado se procedía al mismo tipo de operaciones en la tibia izquierda sana, en una parte de los animales en que se realizó este control, se procedió tras la medida sin periostio a la sección de los troncos nerviosos, como hemos descrito, y a una nueva toma de datos.

Una vez realizadas las medidas, y antes de proceder con el animal siguiente, se abría el tórax con el fin de obtener las costillas para el estudio histológico del callo. Las tibias destinadas al mismo, se extraían al final del análisis de cada serie.

En consecuencia al tiempo empleado para cada animal, agrupamos los mismos en lotes de 3, produciendo las fracturas y las mediciones de manera escalonada en el tiempo. Con ello hemos mantenido un nivel de trabajo continuo, evitando la polarización de los electrodos por fatiga, y de acuerdo con los resultados obtenidos, la dispersión de los datos y la pérdida de material por muerte de los animales, antes o durante la medición, a consecuencia de la anestesia, acumular un número de series suficiente de cada parámetro, para que estos comprendieran el número más similar posible de animales y poder establecer comparaciones válidas entre las distintas muestras.

Hemos realizado un total de doce series de animales, considerando una por cada uno de los plazos en que hemos efectuado las medidas, es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15, 21, 30 y 90 días, con un total de 126 animales empleados y distribuidos de la siguiente forma: una primera serie de 3 animales para comprobar que en la rata, igual que habíamos encontrado previamente en el conejo, era posible detectar la existencia de unos potenciales eléctricos a nivel del hueso, así como para poner a punto la técnica de registro y comprobar la estabilidad de los electrodos, sin presentar grandes oscilaciones en su potencial propio a lo largo de las medidas. La distribución de los demás animales viene expresada en la tabla siguiente:

D I A S	ANIMALES UTILIZADOS	ANIMALES UTILES
01	12	11
02	12	12
03	9	8
04	9	7
05	12	10
06	12	12
07	12	10
10	15	14
15	9	8
21	6	6
30	9	7
90	6	5
T O T A L	123	110



De los 123 animales no resultaron útiles más que 110 (como podemos ver en la tabla anterior), el resto de ellos hasta 23 murieron en el momento de inducir anestesia o durante el proceso de medida que, al prolongarse y requerir una nueva dosis de anestésico, condujo a la muerte del animal.

En la tabla siguiente reseñamos el número de medidas realizadas para cada uno de los parámetros que queremos comparar:

con periost.	sin periost.	G R U P O
18	28	pata control
7	21	fractura inmediata
7	11	1er. día
8	12	2º "
6	8	3er. "
7	7	4º "
7	10	5º "
8	12	6º "
8	10	7º "
14	14	10º "
8	8	15º "
6	6	21º "
7	7	30º "
5	5	90º "
	8	tibia extraída del animal
116	167	

Lo cual representa un total de 283 grupos con un total de 1415 medidas realizadas, teniendo en cuenta que en cada grupo hay 5 posturas diferentes de medida.

En las primeras series hicimos un segundo grupo de medidas, el punto V, colocando el electrodo indiferente a nivel del vértice del fragmento proximal, y el de registro a nivel del extremo proximal del fragmento distal, para poder diferenciar más claramente el potencial existente a nivel de la fractura propiamente dicha, pero como presentaba una gran dispersión de los

valores, no repetimos este registro en las series ulteriores.

Antes de pasar a considerar los valores obtenidos, señalaremos que en varias ocasiones medimos la distancia entre el electrodo de referencia y el de registro, para observar la variación en la misma a lo largo del experimento; teniendo en cuenta las diferencias de talla individual de los animales y las diferencias entre sexos. La media de los valores para dichas distancias fueron:

PUNTO	TIBIA CONTROL	30 DIAS POSTFRACTURA
O	6,0 mm	5,62 mm
I	15,2 mm	15,12 mm
II	24,8 mm	24,37 mm
III	29 mm	26,25 mm
IV	35,1 mm	33 mm

Las medidas se realizaron en 5 y 4 tibias respectivamente. Las diferencias en longitud a partir del punto II, pueden explicarse para éste por la reabsorción del extremo fracturario, al margen de las diferencias ya antes señaladas, y para los otros puntos por la angulación y acabalgamiento que aparece en estas fracturas sin inmovilización y que podemos ver representado en la fig. A . Las cifras más arriba señaladas, nos sirven además para confeccionar las gráficas de los registros obtenidos.

Al contrario que Becker, no hemos podido observar una clara incidencia de la anestesia sobre el valor de los registros, salvo en aquellos animales inmediatamente antes de la muerte, cuando ésta tuvo lugar durante el proceso de análisis y como consecuencia del exceso de anestésico. En los demás animales no hemos encontrado diferencias ostensibles.

- TABLA I -      Valores interelectrodos    en mV.

1,8.	-0,2.	0,5.	1,1.	1,1.	1,0.	2,0.	0,3.	-0,7.	0,9.	1,3.	0,5.
0,5.	-0,1.	0,2.	1,6.	1,4.	1,6.	2,4.	2,0.	1,5.	1,8.	0,4.	1,8.
-0,2.	0,1.	0,1.	0,5.	-1,0.	0,8.	-1,0.	0,3.	1,3.	-1,4.	0,3.	-0,8.
-1,6.	-0,5.	-1,0.	1,3.	-1,6.	-1,4.	0,6.	0,8.	0,2.	-0,1.	-0,1.	1,5.
1,3.	1,1.	1,2.	0,4.	1,0.	0,8.	1,8.	2,0.	-1,4.	-0,3.	-0,2.	-2,4.
-3,1.	0,1.	0,2.	-1,1.	-1,3.	0,6.	0,8.	0,1.	0,3.	-0,1.	0,0.	0,3.
0,4.	1,5.	1,3.	1,6.	1,5.	1,3.	1,4.	1,5.	1,3.	1,4.	-1,1.	-1,7.
-1,3.	-1,0.	-0,6.	-0,5.	1,3.	1,4.	1,7.	1,8.	0,9.	1,2.	1,8.	1,4.
-0,8.	-0,9.	-1,1.	-0,1.	-1,6.	-0,2.	0,2.	-0,5.	-0,4.	-1,6.	1,1.	0,7.
-0,3.	0,5.	-0,2.	0,1.	0,3.	0,9.	1,2.	0,4.	0,1.	0,6.	0,3.	0,2.
0,4.	0,7.	1,1.	0,8.	1,0.	0,5.	-3,3.	-2,5.	-2,4.	-3,4.	-2,3.	-3,3.
-1,3.	-3,0.	-2,2.	-3,2.	-3,2.	-3,5.	-1,8.	-2,5.	-2,3.	-2,5.	-2,9.	-2,9.
-2,9.	-2,9.	1,0.	0,1.	0,3.	0,4.	1,9.	2,1.	1,9.	2,0.	-0,4.	1,1.
0,5.	1,0.	1,0.	0,7.	1,7.	0,4.	2,3.	0,1.	0,3.	0,1.	0,2.	-0,2.
1,7.	-0,1.	1,5.	0,3.	0,5.	0,8.	0,6.	2,1.	1,6.	0,4.	0,5.	-0,3.
0,1.	-0,7.	0,5.	-0,1.	0,2.	0,2.	-0,2.	0,1.	-0,1.	-0,2.	-0,1.	-0,2.
-0,2.	0,2.	1,4.	1,6.	0,5.	0,7.	0,6.	0,5.	0,5.	0,5.	0,3.	0,2.
0,2.	0,4.	1,9.	2,1.	2,0.	1,4.	1,1.	0,7.	1,1.	0,8.	0,6.	0,4.
0,1.	-0,0.	0,1.	0,1.	0,0.	-0,2.	-0,2.	1,5.	1,5.	1,7.	1,8.	1,7.
1,7.	1,8.	1,7.	1,7.	1,7.	1,5.	-1,2.	-1,3.	-1,9.	-1,0.	-1,3.	2,3.
2,9.	-0,5.	0,1.	-0,5.	-0,1.	-0,1.	-0,1.	-0,2.	1,4.	0,4.	-0,6.	-0,2.
0,5.	-1,2.	-0,6.	0,6.	-0,2.	0,4.	1,1.	0,5.	0,6.	1,0.	0,9.	0,8.
0,5.	-3,5.	-0,7.	0,8.	0,3.	0,1.	-0,1.	-0,2.	-0,2.	-0,2.	-0,3.	-0,1.
-0,3.	-0,4.	-0,4.	-0,3.	-0,2.	-0,2.						

Mayor importancia a representado en nuestras manos el grado de humedad de la superficie ósea, así como la desecación del extremo sensible de los electrodos. No hemos hecho un análisis cuantitativo de estos datos, pero hemos podido observar que los valores se hacían extremos con la deseca-ción por lo cual, como hemos señalado, mantuvimos siempre que estuvieran -- fuera de uso el extremo del electrodo en una solución de suero salino con la que, por otro lado, hemos irrigado de forma intermitente la superficie de medida.

Una vez aplicado el electrodo sobre la superficie de medida, siempre que se mantuviera fijo sin cambiar la presión ni desplazarlo sobre ésta (lo que sucedía con cierta facilidad al mantener el electrodo con la mano), se estabilizaba rápidamente el valor del punto de medida y se mantenía a lo -- largo del tiempo, habiendo prolongado éste hasta un minuto durante el cuál, el valor registrado era constante. Sólo los desplazamientos y cambios de -- presión, al variar la superficie de contacto del electrodo, variaban los valores registrados.

En la TABLA I referimos los potenciales interelectrodos que hemos poddido observar a lo largo del trabajo, expresados en milivoltios.

Cuando aparecían valores por encima de  $-3,5$  mV, hemos aplicado una -- corriente depolarizante, como hemos descrito, para normalizar dicho poten-cial. Los valores expresados en mV. fueron:

$-3,8.$   $-6,4.$   $-5,6.$   $-3,7.$   $-4,5.$   $-5,8.$   $-4,8.$   $-6,1.$   $-6,5.$   $-7,0.$   $-6,2.$   
 $-6,6.$   $-5,0.$   $-5,3.$   $-5,2.$   $-5,6.$   $-4,6.$   $-4,0.$   $-4,0.$   $-4,0.$   $-3,9.$

Al margen de estos valores elevados, el valor medio del potencial interelectrodo es:  $0,1612$  mV.

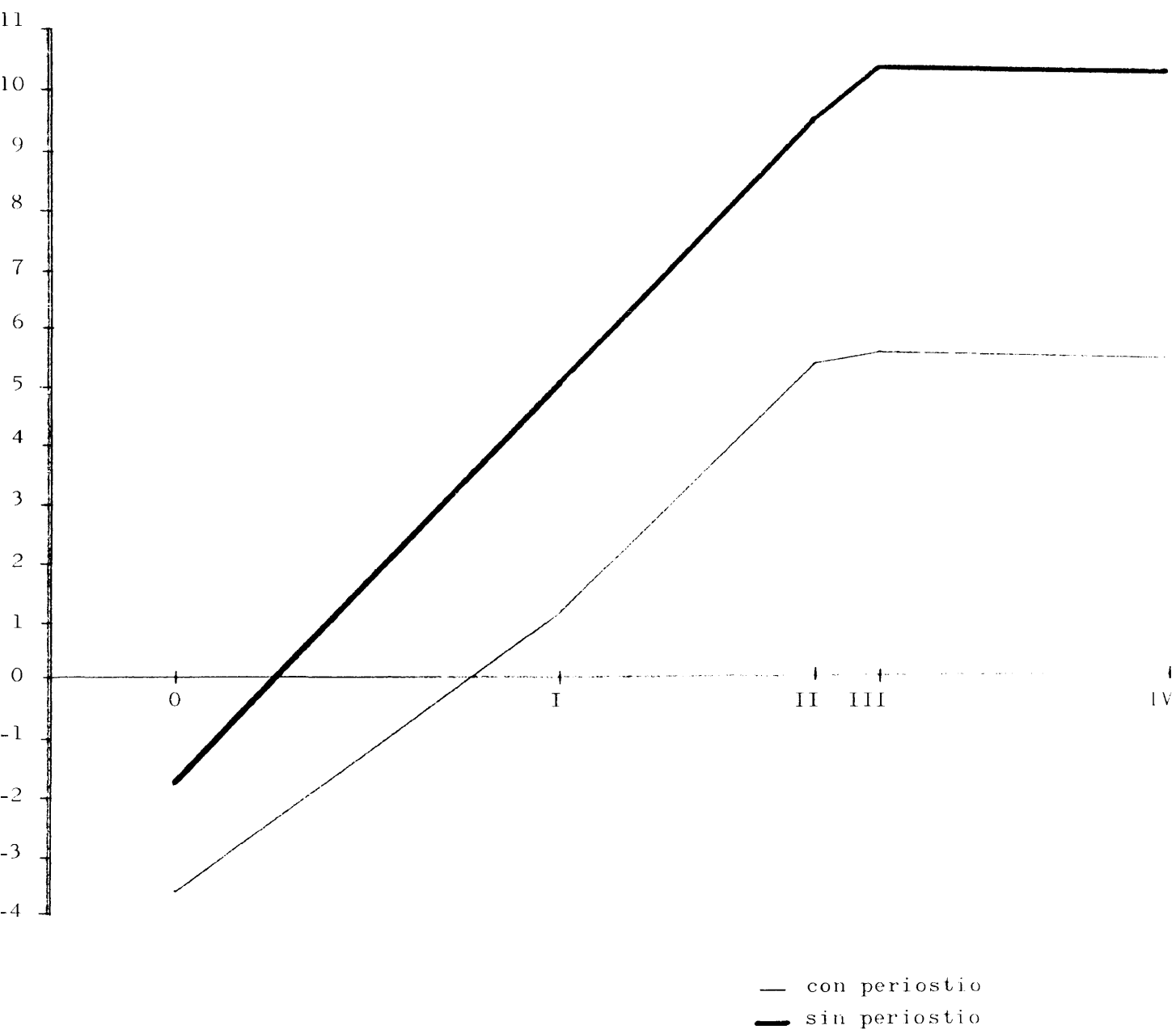
Pasamos a continuación a analizar cada uno de los grupos de medidas realizadas.

TABLA II

Valores obtenidos en tibias control, expresados en mV.

PUNTO :	C O N P E R I O S T I O	S I N P E R I O S T I O
0	-6,8. -3,2. -0,4. -4,9. -3,9. -2,5. -4,0. -3,5. -6,7. -5,7. -6,1. -2,9. -4,5. -2,3. -3,6. -2,3. -3,0. -3,7. -3,5.	-0,8. -0,5. -5,5. 3,0. -3,3. -6,4. -4,2. 1,4. -3,4. -2,9. -4,3. -1,1. -6,9. -4,6. -0,6. 1,9. 0,1. -7,3. 1,3. -0,8. 2,0. -5,9. -2,6. 0,2. -2,8. -0,3. 3,0.
I	0,1. 0,5. 7,3. 5,3. 2,1. 0,4. -1,5. -0,2. 3,0. -2,8. 2,4. -1,8. 3,2. 0,5. 0,3. 0,9. 3,6.	8,7. 4,3. 14,6. 4,8. 10,7. 6,1. 2,2. 4,8. 7,9. 6,0. 9,4. 6,3. 5,4. 6,0. 3,4. 2,4. 3,9. 4,3. 1,4. 2,7. 1,6. 7,3. 7,7. 0,8. 7,1. 0,5. 4,6. 4,0.
II	2,9. 6,1. 12,6. 6,6. 4,7. 4,4. 1,8. 1,6. 5,3. 6,3. 5,5. 6,6. 11,5. 4,6. 1,8. 9,4. 0,9. 5,5.	12,8. 9,5. 13,3. 8,7. 16,7. 12,2. 15,4. 8,8. 12,7. 13,3. 8,7. 9,7. 13,1. 12,0. 7,6. 5,4. 7,5. 3,4. 4,9. 7,3. 7,3. 0,8. 4,2. 14,7. 6,4. 10,9. 5,6.
III	3,6. 6,2. 12,6. 6,8. 4,9. 4,8. 1,8. 1,8. 5,5. 6,7. 5,7. 5,9. 11,6. 5,3. 2,5. 8,9. 0,8. 5,9.	14,5. 16,8. 15,7. 17,4. 12,1. 12,0. 8,4. 13,6. 13,9. 7,3. 10,5. 14,4. 13,0. 8,8. 5,6. 7,5. 4,9. 7,3. 7,3. 10,8. 4,2. 14,7. 6,4. 10,9. 5,6.
IV	3,9. 5,9. 12,0. 6,8. 4,8. 5,0. 2,5. 1,6. 5,1. 6,2. 5,8. 5,9. 10,6. 5,4. 2,7. 9,1. 0,9. 5,8.	12,9. 12,9. 13,5. 14,2. 15,8. 11,4. 11,2. 8,3. 13,2. 13,3. 6,7. 10,3. 13,7. 12,4. 8,5. 5,6. 7,1. 8,2. 7,6. 7,4. 1,6. 4,4. 13,0. 6,7. 13,5 9,1.

G R A F I C A    II



En la TABLA II hemos recogido las medidas de las tibias utilizadas como control, es decir, lo que puede corresponder a los biopotenciales fisiológicos y sus variaciones en relación al periostio. El análisis estadístico nos muestra:

<u>PUNTO</u>	<u>TAMAÑO MUESTRA</u>	<u>MEDIA</u>	<u>DESV.TIPICA</u>	<u>ERROR TIPICO</u>
0	19	-3,642	1,434	0,329
I	17	1,176	2,535	0,615
II	18	5,367	3,158	0,744
III	18	5,539	3,030	0,714
IV	18	5,472	2,800	0,660

para las medidas conservando el periostio y expresando la media en milivolts. Su representación aparece en la gráfica II en relación, además, con los valores medios obtenidos tras la desperiostización cuya primera elaboración estadística es:

<u>PUNTO</u>	<u>TAMAÑO MUESTRA</u>	<u>MEDIA</u>	<u>DESV.TIPICA</u>	<u>ERROR TIPICO</u>
0	28	-1,814	2,916	0,551
I	29	5,086	3,145	0,584
II	28	9,543	3,518	0,665
III	26	10,335	3,875	0,760
IV	27	10,289	3,069	0,591

En dicha gráfica representamos únicamente el valor de la media en relación con los diferentes puntos de registro, cuyas distancias hemos analizado previamente y que aparecen plasmadas en la gráfica, donde vemos que entre epífisis y metáfisis hay un valor negativo que se positiviza en la diáfisis, en la que toma una distribución en meseta.

Mediante el test de la "t" de Student hemos analizado en primer término las diferencias significativas en relación al espacio, y así, conservando el periostio, el punto 0 aparece diferente a todos los demás con una proba

TABLA III

PUNTO	0	-0,4.	-1,4.	3,2.	-3,5.	2,3.	-2,9.	-4,2.	-0,5.	-1,0.	-1,0.	-4,8.
		-1,3.	-0,2.	-0,9.	-0,3.	-2,6.	-2,3.	-4,0.	-2,6.	0,4.	-0,7.	-2,8.
		-0,8.	0,2.	-1,8.	-0,0.	-0,3.	-2,2.					
	I	-3,9.	-0,6.	6,9.	4,8.	5,8.	5,6.	-0,4.	1,2.	6,1.	1,2.	-0,1.
		6,9.	3,1.	3,0.	-1,9.	3,3.	-1,0.	-0,1.	6,5.	-3,3.	2,0.	1,3.
		6,5.	2,1.	4,5.	2,2.	1,4.	2,8.	2,9.				
	II	3,3.	5,7.	2,9.	13,4.	8,2.	-1,9.	5,5.	11,4.	3,9.	7,7.	5,0.
		4,8.	5,2.	4,9.	8,4.	8,3.	11,3.	0,0.	13,9.	7,4.	4,8.	3,6.
		10,8.	8,1.	4,7.	13,7.	11,9.	7,0.	4,0.				
	III	9,4.	8,3.	11,2.	0,0.	13,9.	8,6.	4,8.	3,6.	10,8.	8,1.	4,7.
		13,7.	11,9.	7,0.	8,8.	3,3.	5,7.	2,9.	13,4.	8,2.	2,0.	5,0.
		11,4.	3,9.	7,7.	5,0.	4,8.	5,2.	4,9.				
	IV	6,9.	5,9.	4,9.	5,7.	7,8.	4,1.	7,8.	6,8.	3,8.	8,0.	11,7.
		2,8.	6,0.	4,3.	7,1.	16,6.	15,6.	4,6.	10,8.	11,7.	6,6.	7,1.
		9,0.	14,1.	9,5.	9,6.	8,7.	12,6.					

Medidas en los diferentes puntos, tras desperiostización y sección de los grandes troncos nerviosos.

TABLA IV

PUNTO	0	-1,0.	-0,0.	-0,3.	-0,2.	-0,0.	-0,4.	1,0.	-0,9.
	I	1,2.	1,0.	-0,8.	1,1.	0,2.	-1,2.	1,4.	-0,9.
	II	3,3.	0,8.	-0,8.	1,2.	0,6.	-1,5.	0,9.	-0,4.
	III	2,5.	0,8.	-1,2.	1,0.	0,9.	-0,6.	0,9.	-0,6.
	IV	2,7.	-0,3.	-2,6.	1,5.	0,6.	-1,2.	1,5.	-0,6.



bilidad del 0,001, es decir, del 99%, lo mismo que el punto I con una probabilidad del 0,001 en relación a los siguientes. Los puntos II, III y IV, en nuestro análisis no se diferencian entre sí desde el punto de vista estadístico, como indica también la gráfica.

Tras extirpar el periostio, encontramos en la distribución espacial el mismo tipo de significación estadística que conservando el periostio, es decir, que los puntos 0 y I son diferentes entre sí y en relación a la parte media y distal de la diáfisis, que muestra un valor unitario en meseta.

Si ahora comparamos ambos grupos punto a punto en relación con el periostio, vemos el cálculo de probabilidades así:

P U N T O S :	0	I	II	III	IV
PROBABILIDAD :	0,015	0,001	0,001	0,001	0,001

Lo que de acuerdo con la gráfica nos indica que el valor de la metafisis, en relación con la epífisis, varía poco con la presencia del periostio que por el contrario permite, tras su extirpación, obtener unos valores significativamente más altos aun conservando la misma distribución espacial y polaridad que con el periostio idemne.

Analizamos a continuación las modificaciones que tienen lugar en estos potenciales tras la sección de los grandes troncos nerviosos, como hemos descrito. Los valores registrados están recogidos en la tabla III y su análisis de la media y desviación típica nos muestran:

PUNTO	TAMAÑO MUESTRA	MEDIA	DESVIACION TIPICA	ERROR TIPICO
0	29	-1,407	1,909	0,353
I	29	1,872	3,254	0,604
II	29	6,748	3,848	0,714
III	29	7,114	3,606	0,670
IV	29	8,132	3,510	0,663

Su representación aparece en la gráfica III, en la que se incluye así mismo las medidas en las tibias extirpadas del animal que analizaremos a continuación. Encontramos en el espacio el mismo valor de significación para la diferencia entre los puntos, es decir, que el 0 y el I son estadísticamente diferentes entre sí, y con los puntos II, III y IV son similares.

Si comparamos ahora el conjunto de los valores de la tibia desperios-tizada y los del miembro denervado encontramos:

P U N T O :	0	I	II	III	IV
PROBABILIDAD:	0,550	0,001	0,001	0,001	0,025

lo que representa qué si los grandes troncos nerviosos tienen alguna influen-cia real sobre los potenciales registrados sólo es a nivel de la diáfisis, en tanto que los valores en la proximidad de las metáfisis no se modifican signi-ficativamente con la presencia o no del tejido neural.

Si comparamos estadísticamente los valores normales con periostio y - los obtenidos tras la denervación observamos:

P U N T O :	0	I	II	III	IV
PROBABILIDAD :	0,001	NO ES	NO ES	NO ES	0,01

con lo que podemos ver que existe una diferencia clara sólo para el punto 0, y con un error del 10% para el punto IV, lo que viene a equiparar la presen-cia del periostio a la sección de los grandes troncos nerviosos, en relación a la intensidad de los valores registrados.

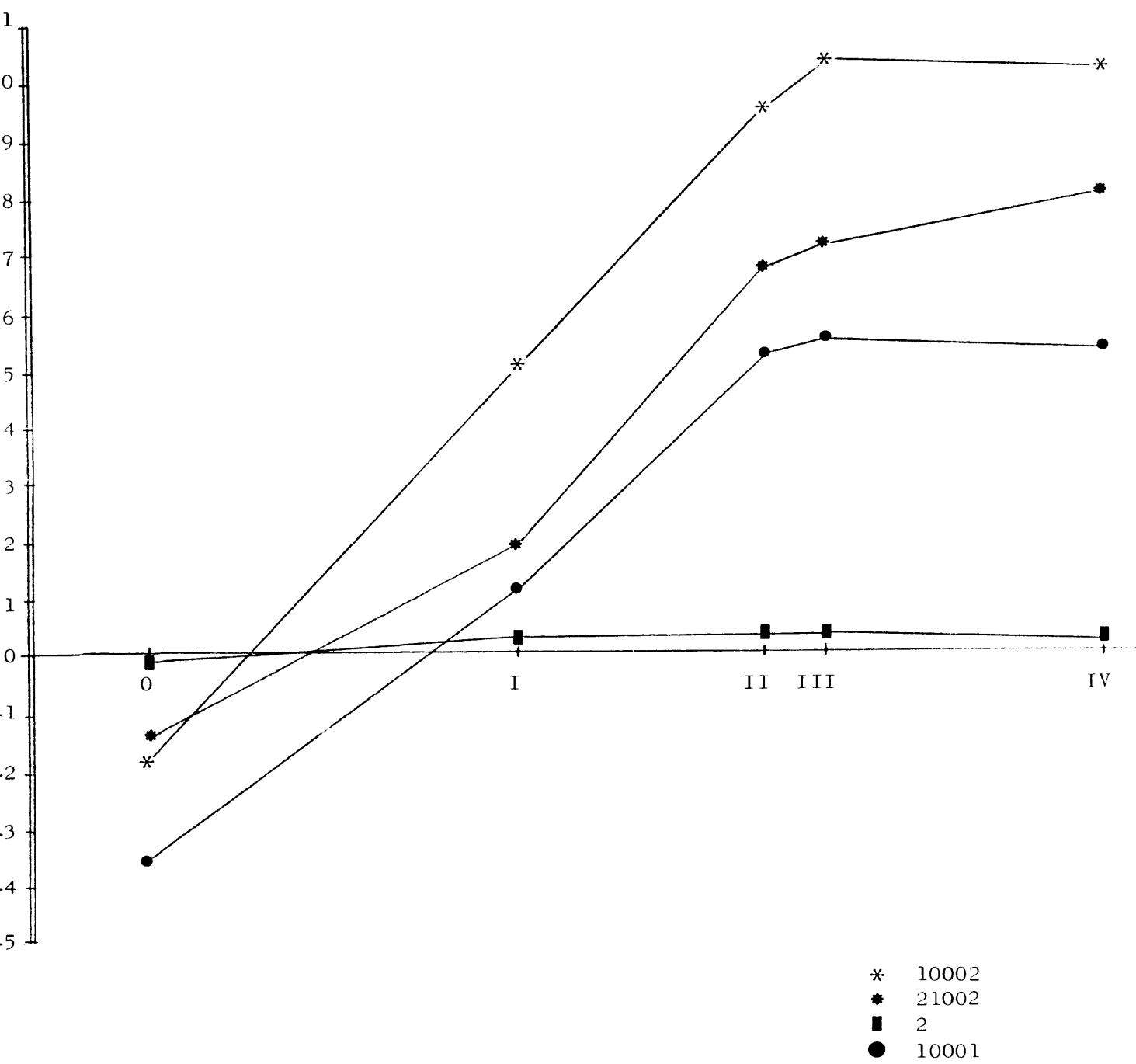
Antes de pasar a considerar el efecto de la rotura ósea, analizaremos los datos obtenidos en las tibias extraídas del animal y mantenidas hidratada-das. Las medidas vienen referidas en la TABLA IV y su análisis es:

TABLA V

Valores obtenidos inmediatamente tras la fractura de la tibia previamente registrada como hueso control .

PUNTO :	<u>C O N   P E R I O S T I O</u>	<u>S I N   P E R I O S T I O</u>
0	-6,8. -3,2. -0,4. -3,9. -2,5. -4,0. -3,5. -6,7. -5,7. -6,1. -2,9. -2,3. -3,6. -2,3. -3,0. -3,7. -3,5. -4,5.	-0,8. -0,5. -5,5. 3,0. -3,3. -6,4. -4,2. 1,4. -3,4. -2,9. -4,3. -1,1. -6,9. -4,6. -0,6. 1,9. 0,1. -7,3. 1,3. -0,8. 2,0. -5,9. -2,6. 0,2. -2,8. -0,3. 3,0.
I	0,1. 0,5. 7,3. 5,3. 2,1. 0,4. -1,5. -0,2. 3,0. -2,8. 2,4. -1,8. 3,2. -0,5. 0,3. -0,9. 3,6.	8,7. 4,3. 14,6. 4,8. 10,7. 6,1. 2,2. 4,8. 7,9. 6,0. 9,4. 6,3. 5,4. 6,0. 3,4. 2,4. 3,9. 4,3. 1,4. 2,7. 1,6. 7,3. 7,7. 0,8. 7,1. 0,5. 4,6. 4,0.
II	2,9. 6,1. 12,6. 6,6. 4,7. 4,4. 1,8. 1,6. 5,3. 6,3. 5,5. 6,6. 11,5. 4,6. 1,8. 9,4. 0,9. 5,5.	12,8. 9,5. 13,3. 8,2. 16,7. 12,2. 15,4. 8,8. 12,7. 13,3. 12,0. 7,6. 5,4. 7,5. 3,4. 4,9. 7,3. 7,3. 0,8. 4,2. 14,7. 6,4. 0,9. 5,6.
III	3,6. 6,2. 12,6. 6,8. 4,9. 4,8. 1,8. 5,5. 6,7. 5,7. 5,9. 11,6. 5,3. 2,5. 8,9. 0,8. 5,9.	14,5. 16,8. 15,7. 17,4. 12,1. 12,0. 8,4. 13,6. 13,9. 7,2. 10,5. 14,4. 13,0. 8,8. 5,6. 7,5. 4,9. 7,3. 7,3. 10,8. 4,2. 14,7. 6,4. 10,9. 5,6.
IV	3,9. 5,9. 12,0. 6,8. 4,8. 5,0. 2,5. 1,6. 5,1. 6,2. 5,8. 5,9. 10,6. 5,4. 2,7. 9,1. 0,9. 5,8.	12,9. 12,9. 13,5. 14,2. 15,8. 11,4. 11,2. 8,3. 13,2. 13,3. 6,7. 10,3. 13,7. 12,4. 8,5. 5,6. 7,1. 8,2. 7,6. 7,4. 11,6. 4,4. 13,0. 6,7. 13,5. 9,1.

G R A F I C A    I I I



<u>PUNTO</u>	<u>TAMAÑO MUESTRA</u>	<u>MEDIA</u>	<u>DESVIACION TIPICA</u>	<u>ERROR TIPICO</u>
0	8	-0,175	0,563	0,199
I	8	0,262	0,896	0,317
II	8	0,475	1,316	0,465
III	8	0,462	1,062	0,375
IV	8	0,225	1,535	0,543

Estos valores aparecen también representados en la gráfica III, en la que vemos que los registros obtenidos son muy diferentes. No hemos analizado la diferencia de valores a lo largo de la tibia, en estos casos, y sólo hemos establecido el criterio de validez en relación con las medidas tanto con/sin periostio en el hueso intacto y que expresamos a continuación:

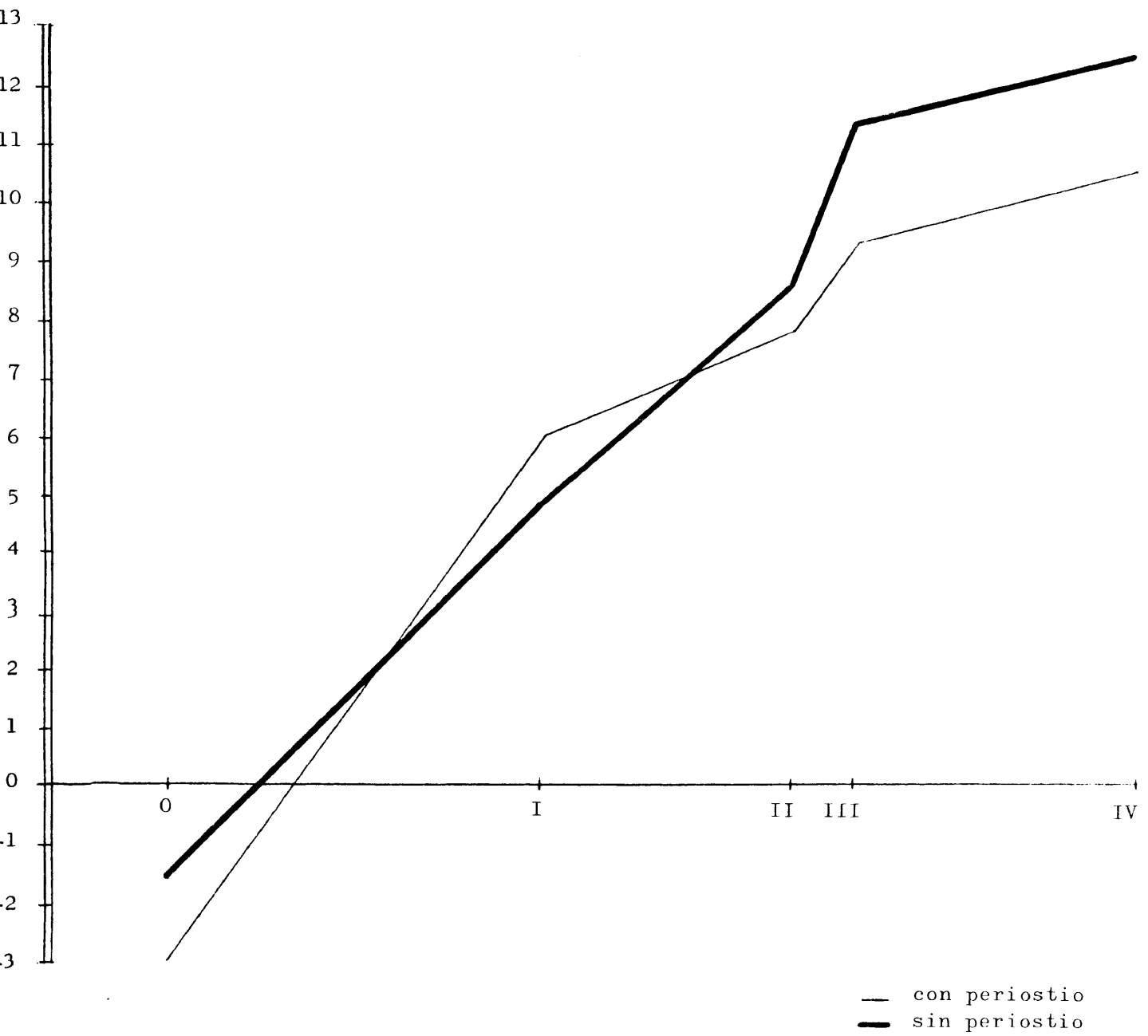
P U N T O :	0	I	II	III	IV
<u>PROBABILIDAD</u>					
CON PERIOSTIO :	0,001	0,350	0,001	0,001	0,001
SIN PERIOSTIO :	0,150	0,001	0,001	0,001	0,001

lo que indica que la extirpación del hueso con desconexión de su vascularización e inervación, así como la muerte celular, que por los estudios de Axhausen, etc., sabemos ocurre aproximadamente a la media hora de la extracción ósea, aún conservando el hueso en solución salina.

Pasamos ahora a analizar el efecto de la fractura sobre estos potenciales registrados.

En la TABLA V hemos recogido todas las medidas hechas inmediatamente tras la fractura manual de la tibia, sobre la cuál habíamos efectuado previamente las medidas que nos sirven de control y que acabamos de exponer. La elaboración estadística de los registros efectuados conservando -

G R A F I C A    I V



el periostio es :

<u>PUNTO</u>	<u>TAMAÑO MUESTRA</u>	<u>MEDIA</u>	<u>DESVIACION TIPICA</u>	<u>ERROR TIPICO</u>
0	6	-3,033	2,631	1,074
I	6	6,033	3,884	1,586
II	7	7,829	2,168	0,819
III	7	9,329	2,661	1,006
IV	7	10,571	2,807	1,061

donde la media, como en los demás valores, viene expresada en milivoltios. La representación gráfica de estos valores y los obtenidos tras retirar el periostio vienen plasmados en la gráfica IV.

La elaboración de los datos de la TABLA V tras la estirpación del - periostio es la siguiente:

<u>PUNTO</u>	<u>TAMAÑO MUESTRA</u>	<u>MEDIA</u>	<u>DESVIACION TIPICA</u>	<u>ERROR TIPICO</u>
0	12	-1,675	1,994	0,576
I	22	4,895	3,723	0,794
II	21	8,576	3,539	0,772
III	21	11,362	3,382	0,738
IV	21	12,471	3,653	0,797

Si analizamos en el espacio los puntos en esta serie sin periostio, vemos que con un significado del 0,001 los valores de 0 son diferentes a los demás, lo mismo que el punto I en relación con los otros. El punto II es diferente en un 99% de los casos de los dos puntos anteriores y del punto IV, en tanto que, en relación al punto III, es decir, a través de la fractura, el significado cae a un valor de 0,015. Observamos así que las relaciones han cambiado inmediatamente después de la fractura, ya que, en la - tibia idemne a partir del punto II, los valores registrados no mostraban - una diferencia estadísticamente significativa. Es de señalar además, que el menor grado de diferencia aparece con esta disposición de los electro - dos a ambos lados de la fractura.

Si comprobamos ahora las dos series entre sí, vemos que la diferencia encontrada en el grupo previo se pierde:

P U N T O :	0	I	II	III	IV
PROBABILIDAD :	0,250	0,550	0,650	0,150	0,250

es decir, el periostio en este momento no juega ningún papel.

El paso siguiente será comparar los resultados obtenidos con los reseñados a nivel de la tibia idemne. Observamos que sólo existen diferencias - significativas si comparamos las medidas sobre la tibia normal conservando - el periostio y las obtenidas tras la fractura, siendo especialmente signifi- cativas si se comparan con los registros hechos tras la rotura ósea y la de nudación perióstica. Su análisis estadístico es:

P U N T O :	0	I	II	III	IV
PROBABILIDAD :	0,550	0,001	0,055	0,015	0,001

para las medidas conservando el periostio. Tras la extirpación del mismo el cuadro queda:

P U N T O :	0	I	II	III	IV
PROBABILIDAD :	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
	0,850	0,850	0,350	0,350	0,025

representando la segunda fila de probabilidades la comparación de ambos gru- pos de medidas tras la extirpación perióstica. Con lo que vemos que la rela ción entre los puntos se altera tras la fractura, pero que no es clara la mo dificación respecto al hueso idemne, más que si se compara teniendo en cuen- ta el efecto modificador del periostio.

A las 24 horas de sucedida la fractura de la serie de 12 animales em pleados nos han servido sólo 11 para la elaboración del trabajo, de los cua- les sólo en 7 pudimos hacer el registro conservando el periostio el cuál se



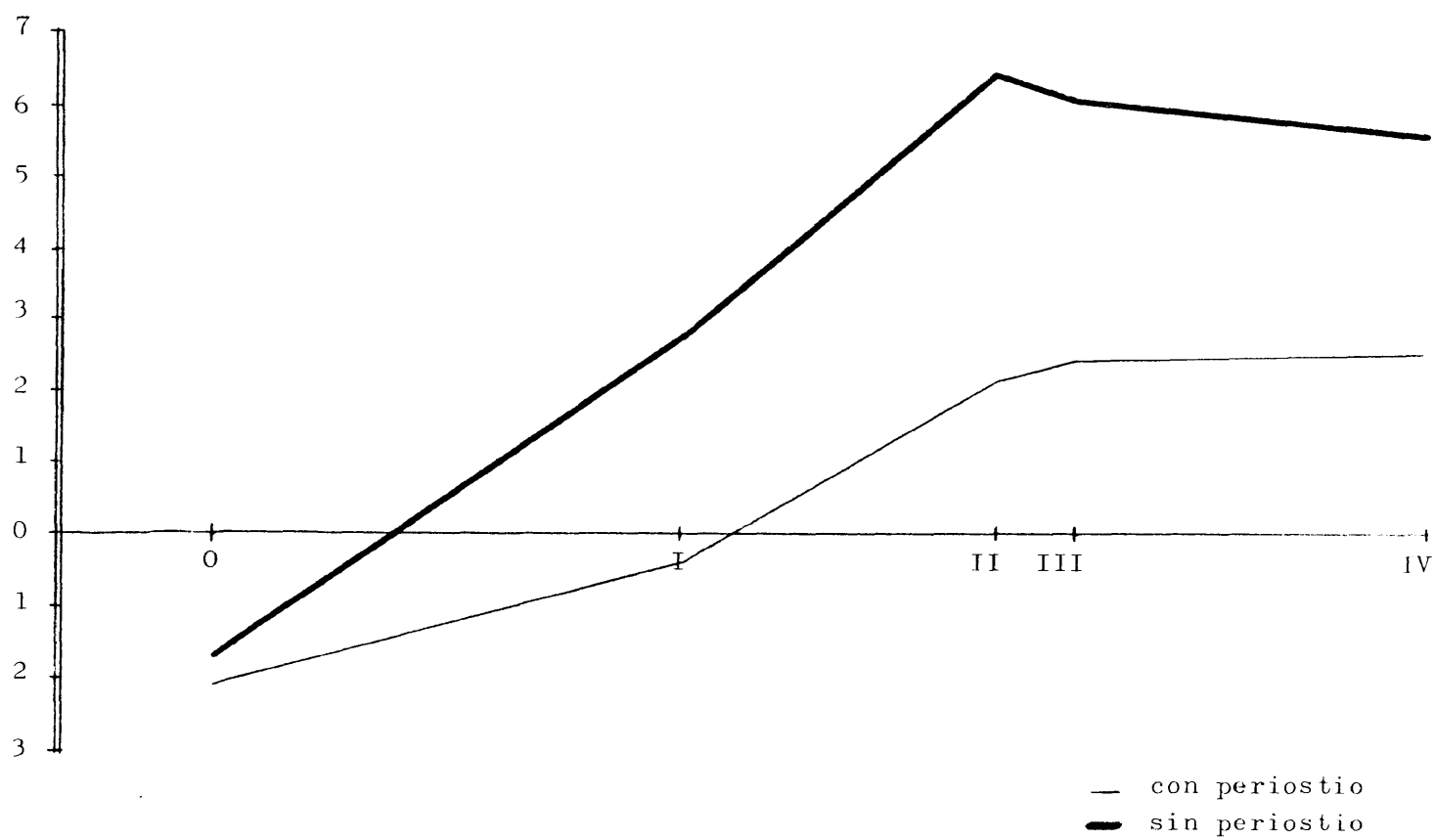
**TABLA VI** Valores registrados en el primer día postfractura .-

PUNTO :	<u>C O N P E R I O S T I O</u>	<u>S I N P E R I O S T I O</u>
0	-3,0. -1,4. -5,6. -0,1. -0,9 -0,3. -4,3.	-1,6. -4,2. -1,0. -0,8. -0,2. -1,0. -0,2. -5,4.
I	-1,0. -1,9. -0,9. 0,0. 1,2. 0,4. 4,9.	5,3. 4,7. 6,4. -2,0. -5,2. 1,8. 2,7. 3,9. 2,0. 4,1. 7,4.
II	0,2. 2,0. 1,8. 1,2. 2,3. 1,9. 6,1.	4,6. 5,4. 7,8. 5,8. 9,2. 4,4. 6,5. 6,2. 5,7. 5,9. 10,9.
III	1,1. 2,0. 2,2. 1,7. 2,9. 1,9. 6,0.	5,4. 5,6. 7,8. 6,0. 9,2. 6,8. 6,9. 6,8. 6,2. 7,0. 10,6.
IV	1,3. 2,2. 2,4. 1,7. 2,8. 2,2. 6,0.	5,7. 5,6. 7,6. 5,7. 10,0. 6,4. 5,9. 6,9. 1,0. 7,2. 10,4.

**TABLA VII** Valores registrados a las 48 horas de la fractura .-

PUNTO :	<u>C O N P E R I O S T I O</u>	<u>S I N P E R I O S T I O</u>
0	-1,0. -5,7. -0,6. -3,2. -0,1. -0,9. -0,3. -4,3.	-4,2. -5,3. -0,6. -1,0. -0,2. -1,0. -0,2. -5,4.
I	0,5. -2,4. 2,5. 0,8. 0,0. 1,2. 0,4. 4,9.	7,1. 10,5. 4,0. 0,1. 1,5. 6,7. 6,5. 4,1. 3,9. 2,0. 4,2. 7,4.
II	1,2. 0,4. 3,9. 3,2. 1,2. 2,3. 1,9. 6,0.	11,3. 15,3. 6,3. 2,1. 3,9. 8,8. 8,2. 5,6. 6,2. 5,7. 5,9. 10,9.
III	1,7. 1,1. 4,8. 3,2. 1,7. 2,9. 1,9. 6,0.	12,1. 15,7. 6,2. 5,2. 5,6. 7,6. 9,0. 5,9. 6,8. 6,2. 7,0. 10,6.
IV	0,7. 1,1. 0,8. 1,4. 1,7. 2,8. 2,2. 6,0.	11,6. 16,1. 6,4. 6,0. 5,3. 8,1. 8,6. 5,7. 6,9. 1,0. 7,2. 10,4.

G R A F I C A   V   ( 24 h. )



rasga con facilidad por la poca estabilidad de la fractura en ese momento. Los datos de estas 7 medidas están recogidas en la TABLA VI. Su elaboración en relación a la media y la desviación típica y standard o error típico es:

<u>PUNTO</u>	<u>TAMAÑO MUESTRA</u>	<u>MEDIA</u>	<u>DESVIACION TIPICA</u>	<u>ERROR TIPICO</u>
0	7	-2,143	1,986	0,744
I	7	-0,486	3,286	1,242
II	7	2,129	1,710	0,646
III	7	2,471	1,526	0,577
IV	7	2,571	1,469	0,555

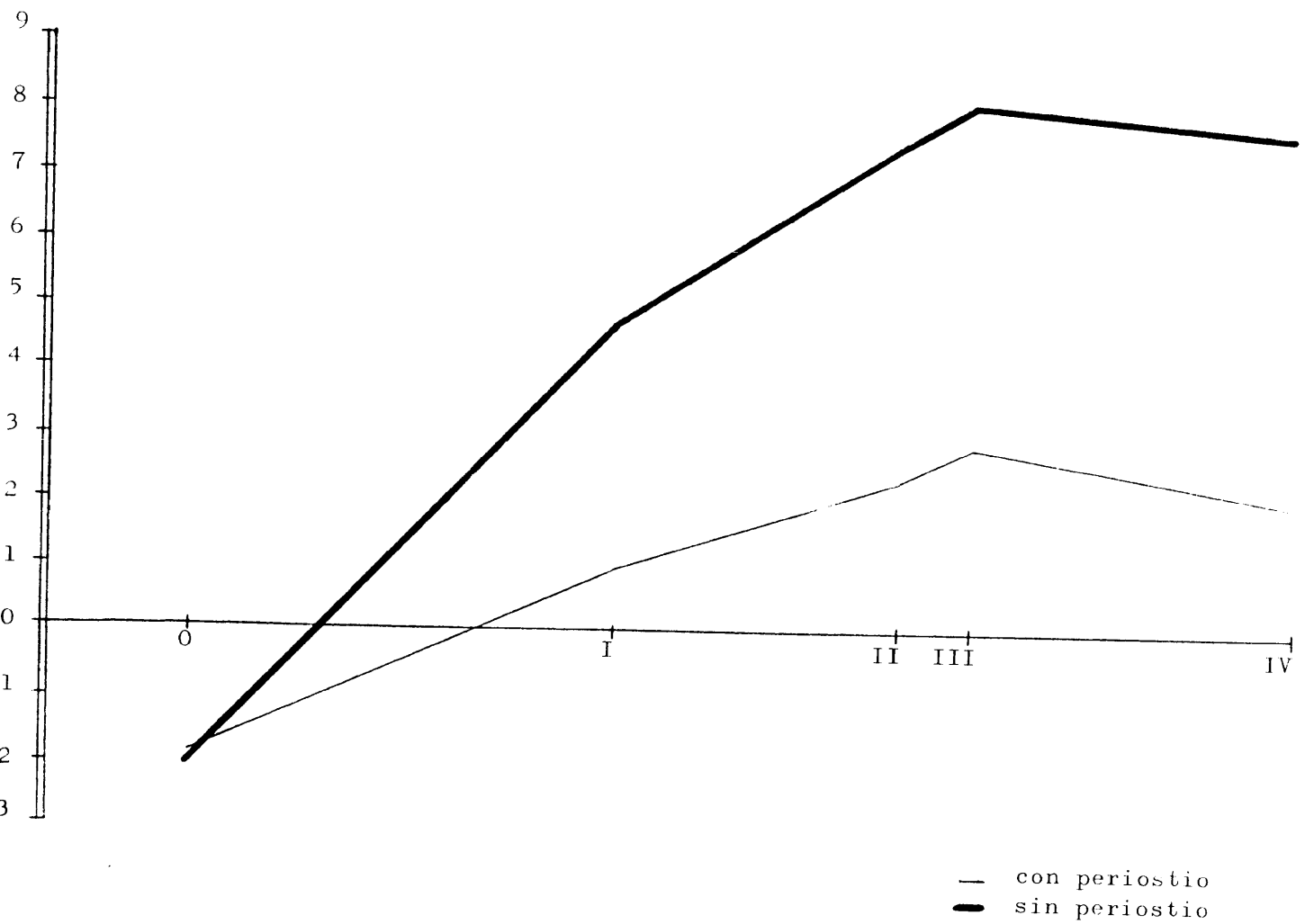
La representación gráfica de estos valores aparece en la V junto a los datos obtenidos tras extirpación del periostio. Vemos que no existe -- una diferencia estadística entre los puntos 0 y I, pero sí de éstos con los puntos II, III y IV, entre los cuales a su vez no hay diferencia.

Las medias de los valores para las 11 medidas en el primer día post-fractura, tras extirpación del periostio, consignadas en la tabla VI son:

<u>PUNTO</u>	<u>TAMAÑO MUESTRA</u>	<u>MEDIA</u>	<u>DESVIACION TIPICA</u>	<u>ERROR TIPICO</u>
0	8	-1,725	1,798	0,636
I	11	2,764	3,454	1,042
II	11	6,491	1,885	0,568
III	11	6,036	3,909	1,179
IV	11	5,500	4,195	1,265

En relación a la distribución espacial encontramos una diferencia -- con un nivel de significación del 0,005 entre el punto 0 y el I y, entre el I, II y siguientes. Si comparamos ahora ambos parámetros entre sí observamos:

G R A F I C A VI ( 48 h. )



P U N T O :	0	I	II	III	IV
PROBABILIDAD :	0,750	0,055	0,001	0,055	0,150

lo que indicaría que el periostio sólo modifica la medida a nivel del vértice del fragmento proximal.

Hemos de comparar ahora estos valores sin periostio en relación con la medida efectuada en hueso íntegro, así como inmediatamente después de la fractura que vienen expresados en la 1ª y 2ª fila de probabilidades siguientes:

P U N T O :	0	I	II	III	IV
PROBABILIDAD :	0,750	0,005	0,001	0,001	0,001
	0,650	0,005	0,001	0,001	0,001

Con esto vemos que el punto 0 no modifica significativamente sus valores y sí los demás puntos, cuya significación estadística aumenta en torno a la fractura y en el punto más distal.

Pasamos ahora a analizar los datos derivados en el 2º día tras la -- fractura. Estos datos se han obtenido de una serie de 12 animales, de los -- cuales en 8 se lograron medidas útiles conservando el periostio. Estas apa\_ --  
recen en la TABLA VII.

<u>PUNTO</u>	<u>TAMAÑO MUESTRA</u>	<u>MEDIA</u>	<u>DESVIACION TIPICA</u>	<u>ERROR TIPICO</u>
0	8	-1,925	1,965	0,695
I	8	0,950	1,917	0,678
II	8	2,350	1,819	0,643
III	8	2,825	1,622	0,574
IV	8	2,000	1,651	0,584

La representación aparece en la gráfica VI, junto a los obtenidos tras la desperiostización recogidos en la TABLA VII cuyas medias y desviaciones son:

<u>PUNTO</u>	<u>TAMAÑO MUESTRA</u>	<u>MEDIA</u>	<u>DESVIACION TIPICA</u>	<u>ERROR TIPICO</u>
0	8	-2,162	2,145	0,758
I	12	4,775	2,802	0,809
II	12	7,417	3,462	0,999
III	12	8,075	3,036	0,876
IV	12	7,675	3,546	1,024

En este cuadro, como en todos los anteriores y siguientes, el valor de la media para cada uno de los puntos registrados viene expresada en milivoltios.

El análisis en el espacio nos muestra que para el registro sin periostio los datos no son conclusivos, en tanto que para las medidas sin periostio, como en otras ocasiones, el punto 0 y el I son significativamente distintos entre sí y también de los demás. Los puntos II, III y IV no se diferencian entre sí desde un punto de vista estadísticamente válido. El análisis de la gráfica nos muestra que ambos grupos se diferencian conservando una morfología similar en todos los puntos salvo en el punto 0.

P U N T O :	0	I	II	III	IV
PROBABILIDAD:	0,850	0,001	0,001	0,001	0,001

Pasaremos a analizar estos valores en relación a los de 24 horas. La simple observación de las medias nos indica que las medidas con y sin periostio comparadas entre sí a las 24 y 48 horas, son bastante similares como podemos ver, siendo los valores de la columna superior las medidas con periostio y las inferiores sin él.

P U N T O :	0	I	II	III	IV
PROBABILIDAD:	0,850	0,350	0,850	0,750	0,550
	0,750	0,150	0,450	0,250	0,250
	0,450	0,015	0,001	0,001	0,001

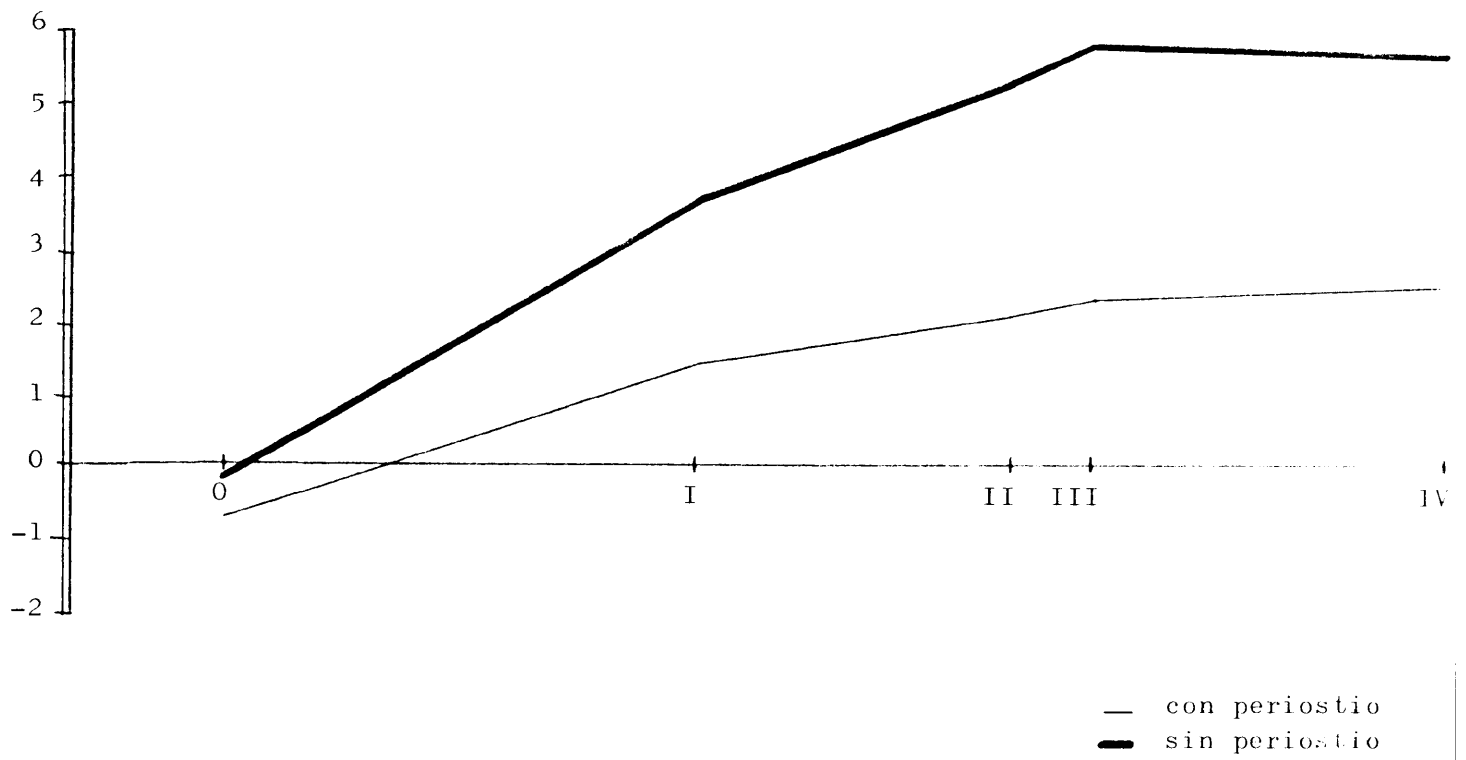
**TABLA VIII**                      Valores en el tercer día postfractura .-

PUNTO :	<u>C O N   P E R I O S T I O</u>	<u>S I N   P E R I O S T I O</u>
0	-0,9. -2,3. -1,6. 1,2. -0,1. -0,7.	0,4. -0,3. 0,6. -1,6.
I	2,8. 0,0. 0,9. 1,6. 2,7. 0,4.	3,5. 3,0. 4,1. 0,0. 8,5. 3,8. 2,1. 4,9.
II	2,0. 5,7. 1,4. 3,0. 0,0. 0,0.	5,0. 4,2. 5,8. 2,2. 9,3. 7,1. 2,6. 6,2.
III	3,0. -0,2. 0,5. 2,3. 6,1. 1,8.	4,5. 5,5. 7,0. 4,3. 9,5. 6,7. 2,8. 6,3.
IV	3,1. 0,3. 0,4. 2,8. 6,2. 2,0.	4,0. 5,2. 7,1. 4,4. 9,5. 6,4. 3,1. 6,3.

**TABLA IX**                      Valores registrados el cuarto día postfractura .-

PUNTO :	<u>C O N   P E R I O S T I O</u>	<u>S I N   P E R I O S T I O</u>
0	-1,8. -1,0. -3,0. 0,0. 0,0. 0,3.	-6,6. 0,6. -0,6. -1,8. -0,7.
I	0,8. 1,2. 1,3. 0,0. 0,3. 1,1. 0,1.	4,5. 2,7. 0,1. 7,2. 3,3. 3,1. 9,2.
II	1,5. 0,8. 0,3. 0,9. 0,7. 1,0. 2,2.	4,3. 3,8. 1,3. 9,4. 6,5. 4,2. 10,3.
III	1,7. 0,7. 0,3. 0,8. 0,9. 0,7. 1,9.	7,1. 4,0. 1,5. 9,5. 6,5. 4,0. 9,9.
IV	2,0. 0,6. 0,3. 0,9. 1,1. 0,9. 1,7.	7,8. 3,9. 1,7. 9,3. 6,9. 4,9. 10,2.

G R A F I C A    VII





La última de estas filas, que representa valores de alta significación estadística, representa la comparación entre los valores obtenidos -- tras la fractura inmediata a las 48 horas conservando el periostio.

Para el 3<sup>er</sup> día hemos empleado 9 animales, de los cuales nos han -- sido útiles 6 para las medidas incluyendo el periostio, y 8 para el segundo grupo de registros.

Los datos globales aparecen obtenidos en la TABLA VIII. Para las medidas con periostio los valores son:

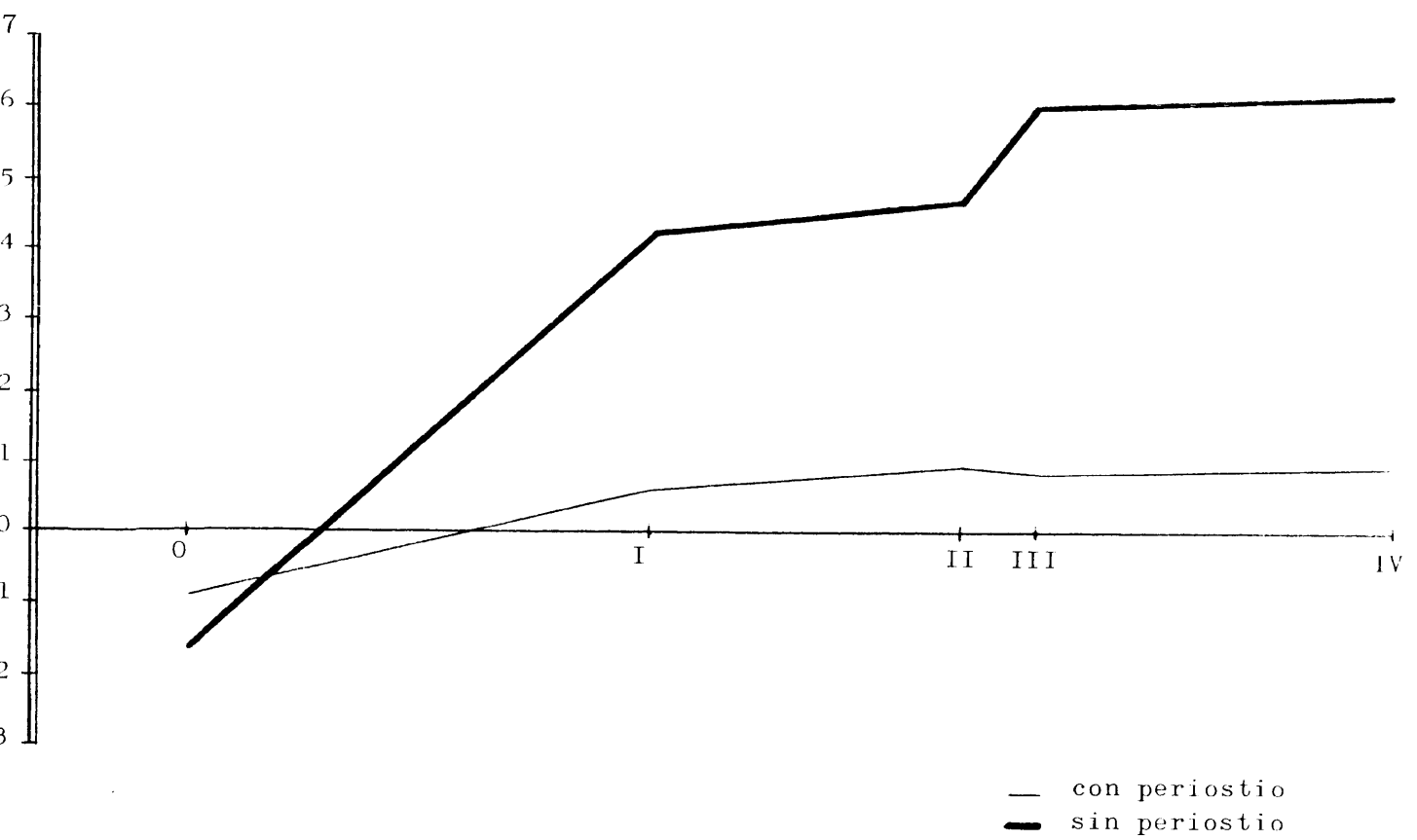
<u>PUNTO</u>	<u>TAMAÑO MUESTRA</u>	<u>MEDIA</u>	<u>DESVIACION TIPICA</u>	<u>ERROR TIPICO</u>
0	6	-0,733	-0,959	0,191
I	6	1,400	1,452	0,290
II	6	2,016	1,393	0,278
III	6	2,250	2,426	0,485
IV	6	2,466	1,100	0,22

Valores que vienen representados en la gráfica VII junto con los obtenidos tras la desperiostización, cuya elaboración con las medias expresadas en milivoltios es:

<u>PUNTO</u>	<u>TAMAÑO MUESTRA</u>	<u>MEDIA</u>	<u>DESVIACION TIPICA</u>	<u>ERROR TIPICO</u>
0	4	-0,225	0,779	0,390
I	8	3,687	2,276	0,805
II	8	5,212	2,192	0,775
III	8	5,775	1,932	0,683
IV	8	5,675	1,912	0,676

La comparación de ambas series entre sí demuestra que sólo existe -- una diferencia significativa del 0,005 a partir del punto I, no así para el punto 0.

G R A F I C A   V I I I



Si comparamos ahora estas series con las series previas, encontramos una diferencia en relación con la pata control, así como con la fractura inmediata en los puntos en torno a la fractura, y no en los puntos 0 y I. Diferencia que por otro lado no se demuestra para las 24 horas. Así tenemos:

P U N T O :	0	I	II	III	IV
PROBABILIDAD :	0,350	0,250	0,001	0,001	0,001
	0,250	0,150	0,001	0,001	0,001
	(0,025)				

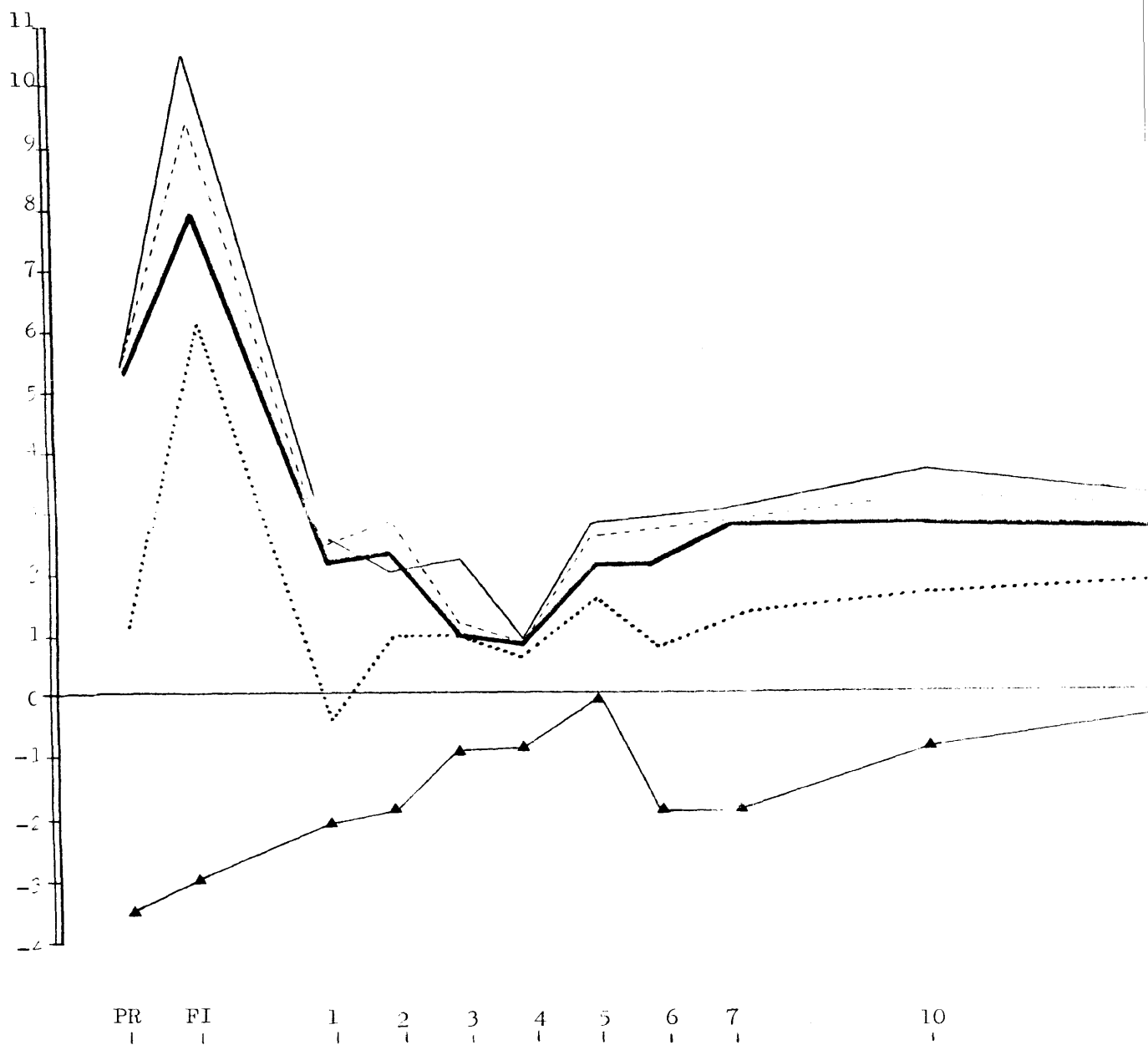
La primera fila es la comparación con el hueso control y la segunda con la fractura inmediata conservando el periostio. La cifra en paréntesis es el valor del mismo punto tras denudación perióstica.

Al cuarto día postfractura hemos analizado 9 animales, de los cuales se perdieron 2, de forma que, tanto para los registros con/sin periostio, - hemos recogido 7 animales útiles en cada una de las series. Sus valores -- vienen referidos en la TABLA IX. La elaboración estadística con la media - expresada en mV es:

<u>PUNTO</u>	<u>TAMAÑO MUESTRA</u>	<u>MEDIA</u>	<u>DESVIACION TIPICA</u>	<u>ERROR TIPICO</u>
0	6	-0,917	1,147	0,468
I	7	0,600	0,487	0,184
II	7	0,929	0,671	0,254
III	7	0,843	0,623	0,235
IV	7	0,929	0,665	0,251

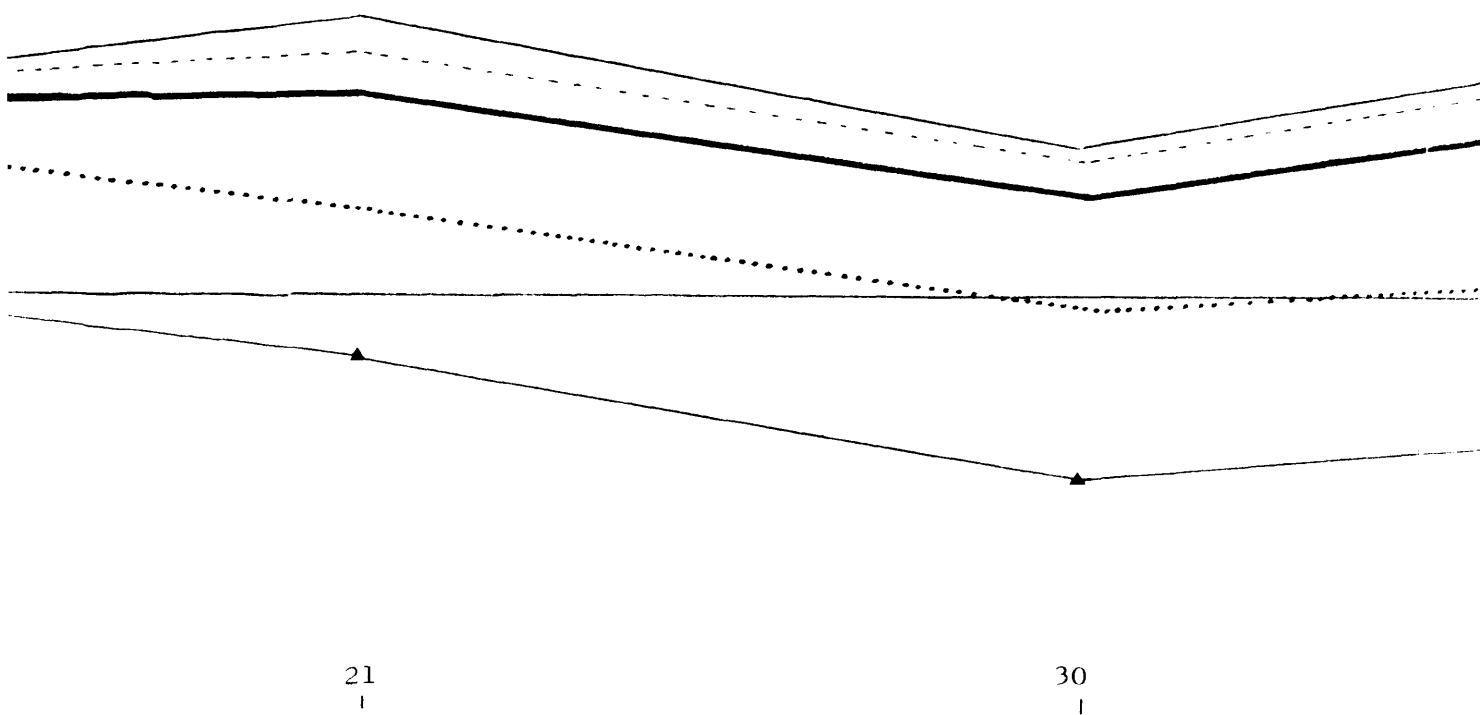
Su representación gráfica aparece en la VIII, junto a los valores sin periostio, cuya primera elaboración es:

<u>PUNTO</u>	<u>TAMAÑO MUESTRA</u>	<u>MEDIA</u>	<u>DESVIACION TIPICA</u>	<u>ERROR TIPICO</u>
0	5	-1,760	2,470	1,105
I	7	4,214	2,807	1,061



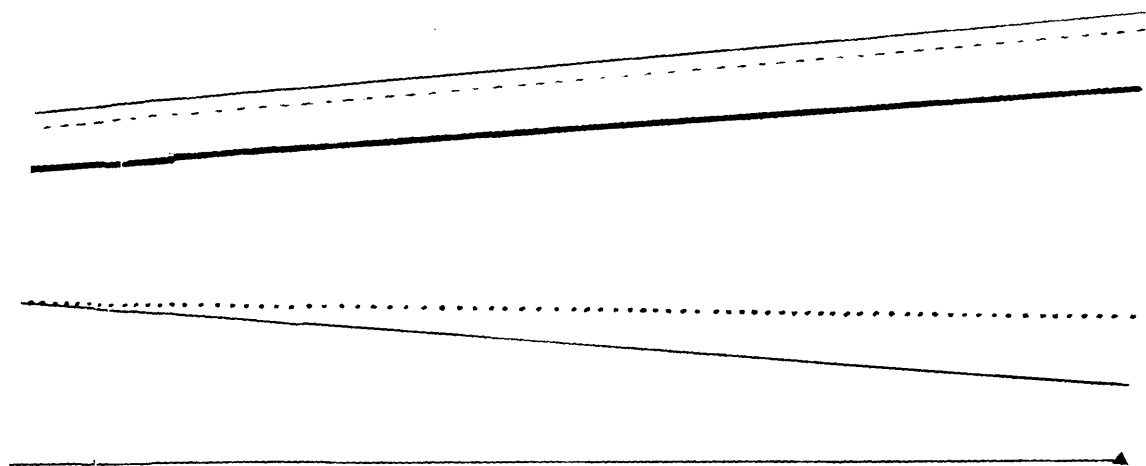
G R A F I C A IX

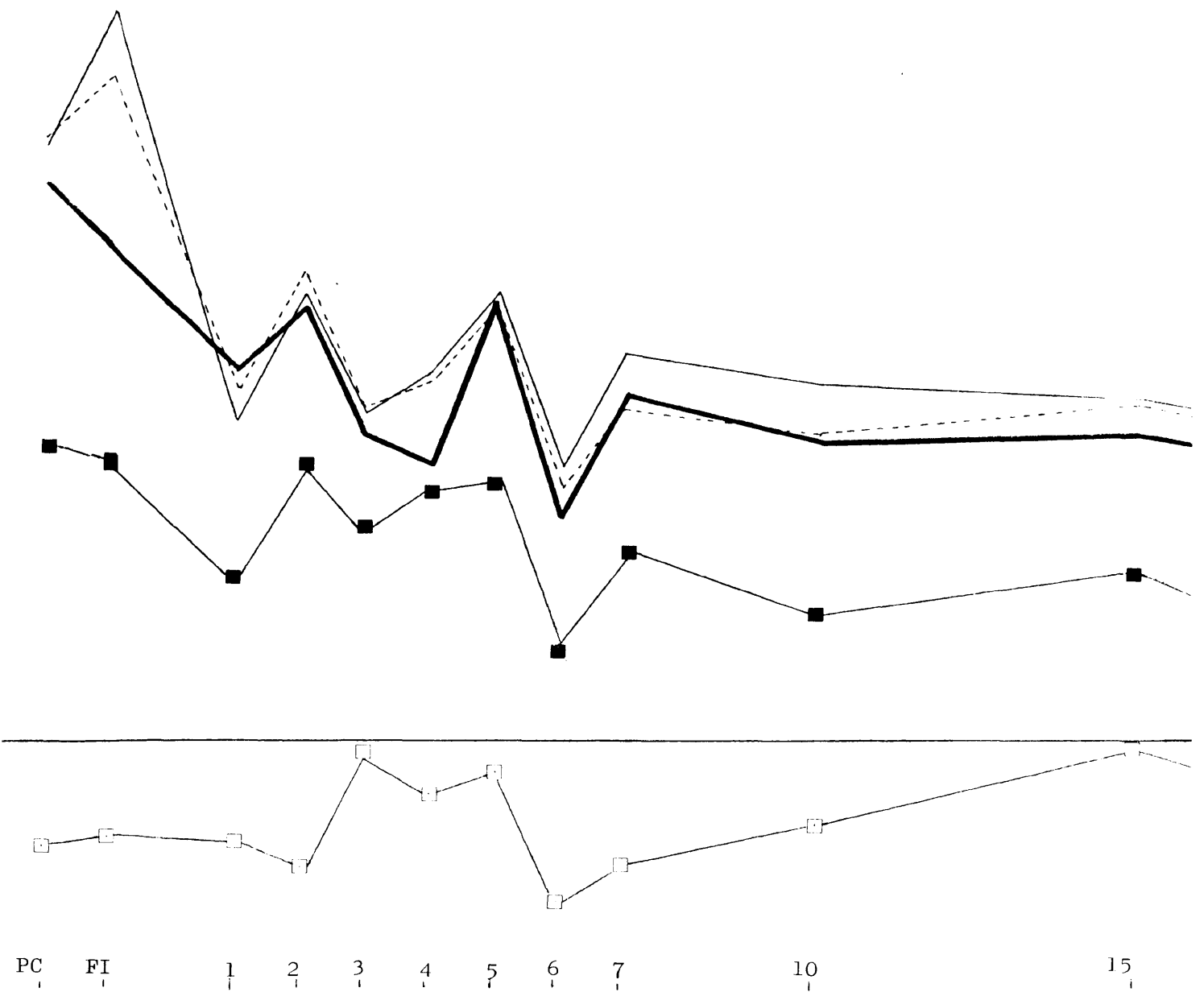
EVOLUCION EN EL TIEMPO DE TODOS  
LOS PUNTOS CONSERVANDO EL PERIOSTIO



PUNTOS

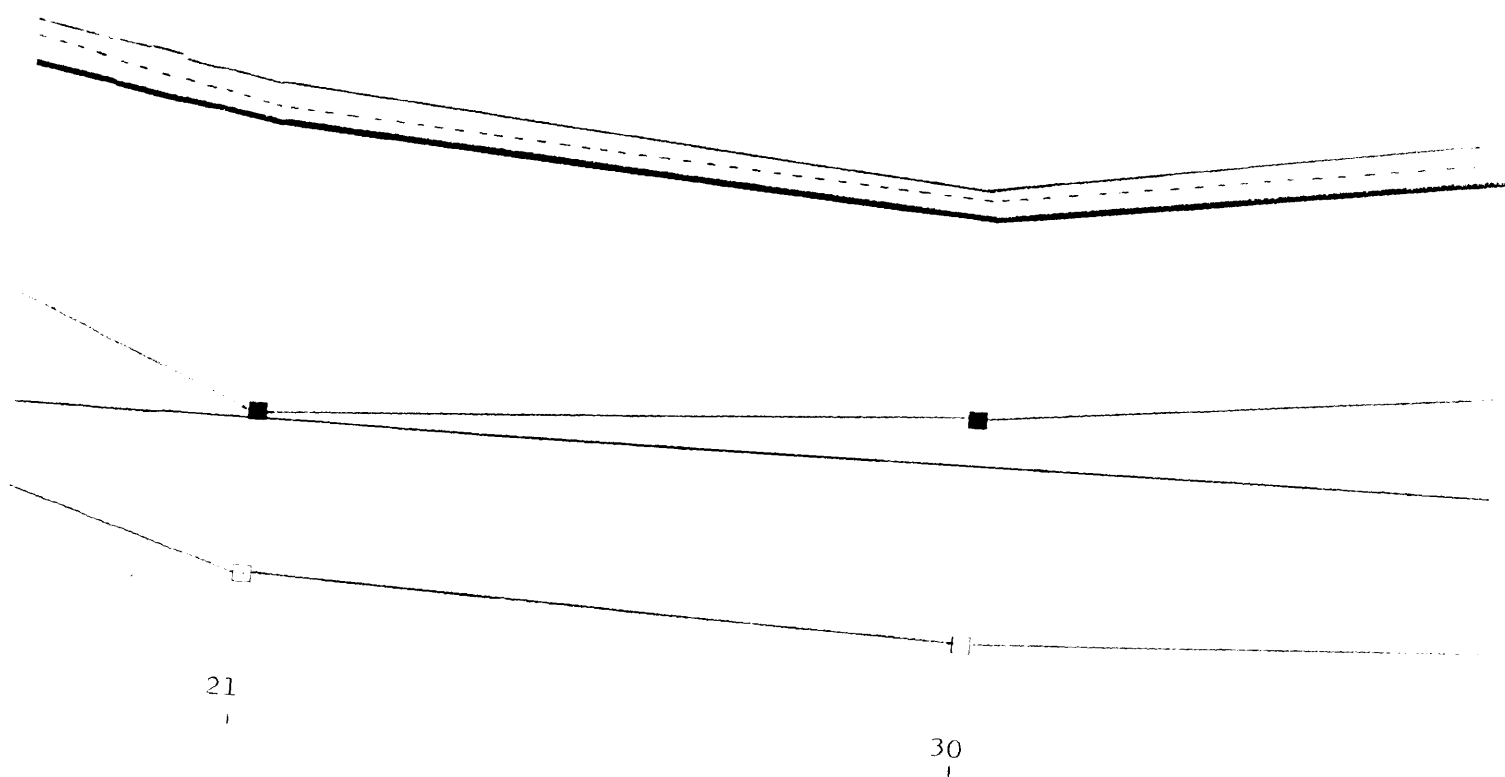
- 0 —▲—
- I .....
- II —■—
- III - - - - -
- IV ———





G R A F I C A   X

EVOLUCION DE TODOS LOS PUNTOS EN EL TIEMPO SIN PERIOSTIO





—

P U N T O S	
0	—□—
I	—■—
II	—■■—
III	—...—
IV	—

—  
—  
—

—■

—

—

<u>PUNTO</u>	<u>TAMAÑO MUESTRA</u>	<u>MEDIA</u>	<u>DESVIACION TIPICA</u>	<u>ERROR TIPICO</u>
II	7	4,743	3,441	1,301
III	7	6,043	2,803	1,071
IV	7	6,286	2,820	1,066

Al analizar estadísticamente la serie con periostio, como ya observamos en la gráfica, no encontramos diferencias válidas entre los puntos. En el grupo sin periostio observamos una clara diferencia entre el punto 0 y los demás, que no lo son por la gran dispersión de las medidas obtenidas. Si pasamos ahora a analizar los resultados entre sí observamos:

P U N T O :	0	I	II	III	IV
PROBABILIDAD :	0,550	0,015	0,025	0,001	0,001

con lo que vemos que la diferencia es más intensa en torno a la fractura y en el fragmento distal como muestra la gráfica.

Si lo comparamos con los datos previos observamos:

P U N T O :	0	I	II	III	IV
PROBABILIDAD :	0,001	0,550	0,001	0,001	0,001
	0,150	0,015	0,001	0,001	0,001

Para las medidas control y la fractura inmediata con el periostio, siendo los valores sin el periostio del mismo valor, pero que no especificamos para no sobrecargar de datos esta relación.

Aparecen representados estos valores con/sin periostio en las gráficas IX y X donde observamos además, que para los registros sin periostio se advierten, en los primeros días postfractura, unas claras oscilaciones de sus valores aunque no sean estadísticamente válidos. Por el contrario y conservando el periostio, las medidas están bastante próximas entre sí en estos primeros 4 días postfractura.

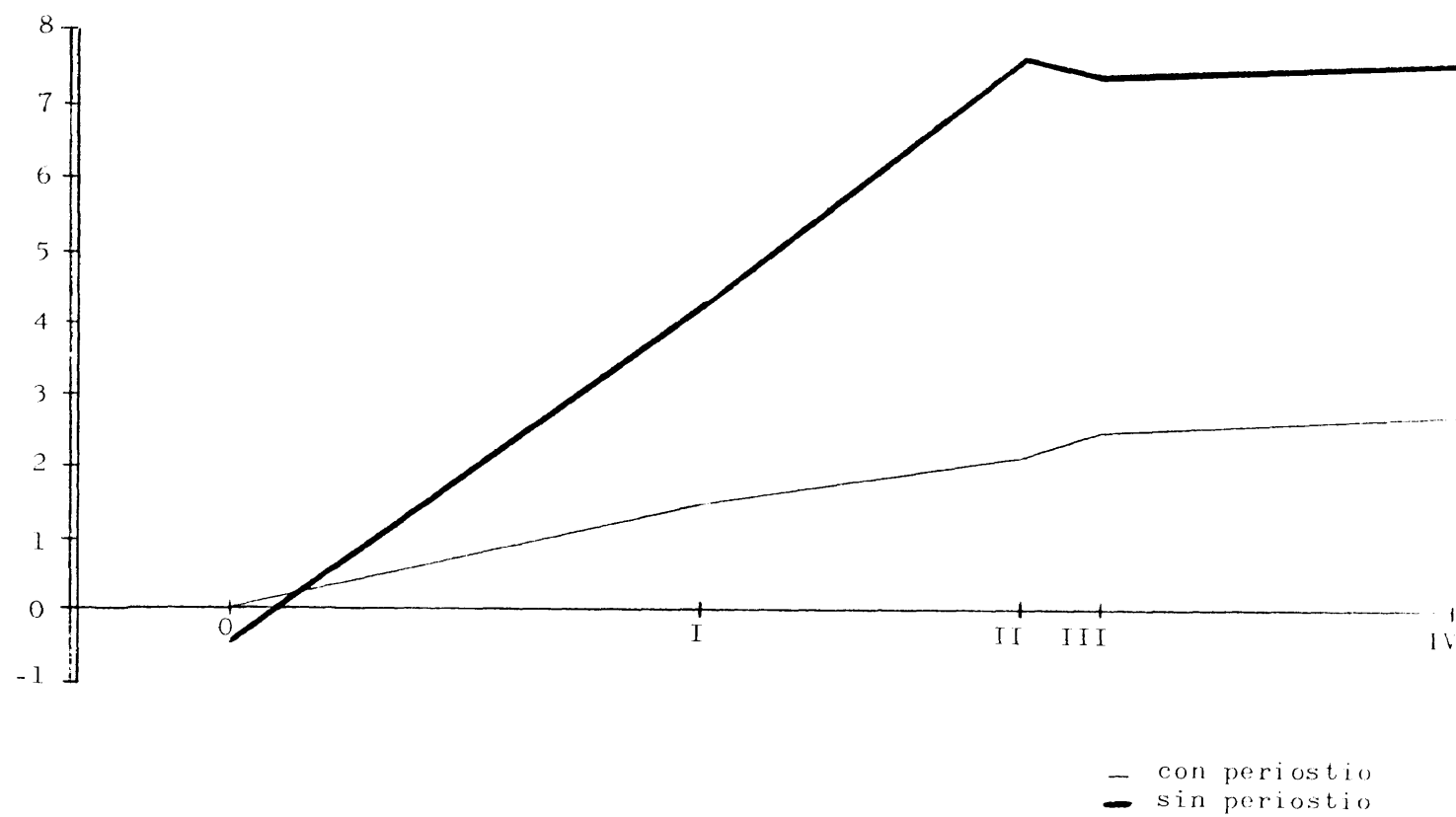
**TABLA X**                      Valores medidos al 5º día tras la fractura .-

PUNTO :	<u>C O N   P E R I O S T I O</u>	<u>S I N   P E R I O S T I O</u>
0	-3,2. 1,2. 0,6. 1,4. 1,2. -0,2. -0,7.	0,6. -1,3. -2,7. -3,1. 1,0. 2,1. -0,6. -1,0. 0,0.
I	-2,0. 2,3. 3,7. 2,5. 1,6. 2,7. 0,4.	4,8. 4,9. 1,9. 1,2. 2,8. 8,0. 7,9. 3,2. 5,4. 4,1.
II	-2,1. 2,1. 4,3. 2,0. 2,0. 5,7. 1,4.	5,5. 7,2. 3,1. 2,3. 5,9. 12,0. 12,1. 6,1. 15,5. 7,4.
III	0,3. 1,9. 4,3. 2,0. 2,3. 6,1. 1,8.	5,6. 7,5. 3,2. 2,2. 5,3. 11,8. 12,2. 7,1. 6,5. 12,2. 8,4.
IV	0,0. 2,3. 4,4. 2,3. 2,8. 6,2. 2,0.	5,6. 7,4. 3,3. 2,4. 5,6. 11,7. 12,5. 7,1. 12,2. 9,0.

**TABLA XI**                      Valores obtenidos en el sexto día postfractura .-

PUNTO :	<u>C O N   P E R I O S T I O</u>	<u>S I N   P E R I O S T I O</u>
0	-0,3. 0,6. -7,0. -1,3. -6,0. -0,9. -1,3. 0,0.	-2,6. -5,4. -2,7. -2,8. -6,3. -2,8. -3,9. -2,8. -2,5. -0,1. 0,0. -1,9.
I	0,9. 1,6. 0,4. 0,2. -4,3. 0,7. 5,9. 1,5.	2,1. 0,2. 1,0. 2,8. 0,2. -0,8. -0,6. 1,5. 0,1. 5,0. 0,9. 6,3.
II	1,0. 1,1. 1,4. 0,8. 0,1. 1,9. 6,3. 5,3.	4,5. 4,1. 3,1. 8,6. 2,0. 1,9. 2,4. 3,1. 1,0. 7,2. 3,0. 6,2.
III	1,3. 2,0. 1,2. 1,3. 1,3. 1,3. 7,8. 5,5.	5,0. 4,2. 3,0. 8,3. 2,2. 2,9. 2,5. 3,4. 1,5. 8,9. 3,8. 7,8.
IV	1,5. 1,8. 1,7. 1,5. 1,7. 1,6. 7,8. 6,1.	5,1. 4,4. 3,1. 7,8. 2,5. 2,9. 2,6. 3,7. 2,5. 10,9. 4,8. 8,0.

G R A F I C A   X I   (5 días postfractura)



Pasamos ahora al quinto día en el cual se incluyen 12 animales. Sólo en 7 se realizaron medidas con periostio y en 10 sin él. Se perdieron 2 animales por muerte y de los 10 restantes en 3 se rasgó el periostio, - inhabilitando así las medidas que se hicieron conservándolo. Los valores aparecen en la TABLA X y encontramos su representación en la gráfica XI . La elaboración estadística de la media en los registros con periostio expresados en milivoltios es:

<u>PUNTO</u>	<u>TAMAÑO MUESTRA</u>	<u>MEDIA</u>	<u>DESVIACION TIPICA</u>	<u>ERROR TIPICO</u>
0	7	0,043	1,430	0,541
I	7	1,529	1,724	0,641
II	7	2,157	2,208	0,834
III	7	2,586	1,767	0,668
IV	7	2,786	1,787	0,675

Podemos observar, al margen de la escasa variación de los valores registrados para cada uno de los puntos, que el punto 0 se ha hecho positivo. Los datos para las medidas sin periostio son:

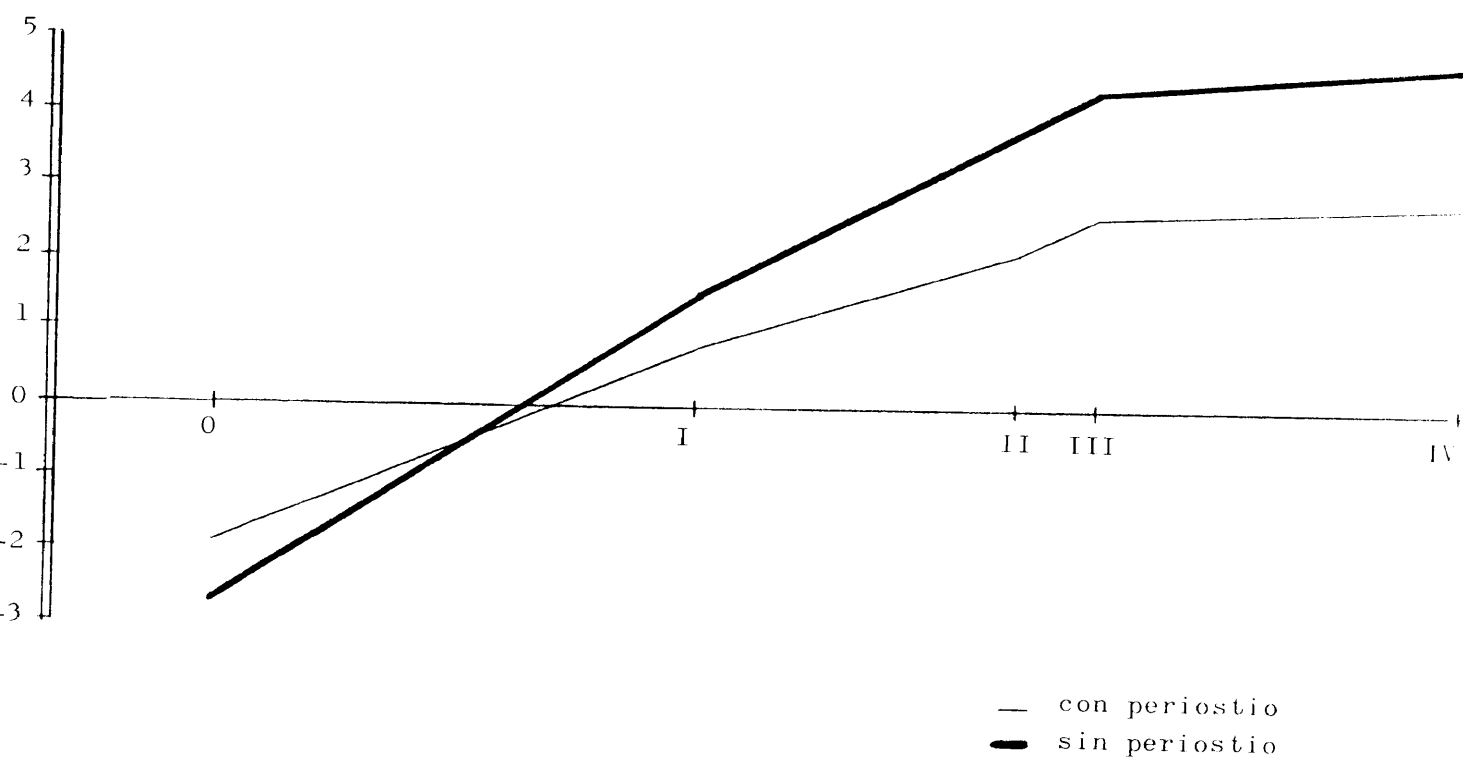
<u>PUNTO</u>	<u>TAMAÑO MUESTRA</u>	<u>MEDIA</u>	<u>DESVIACION TIPICA</u>	<u>ERROR TIPICO</u>
0	9	-0,533	1,533	0,511
I	10	4,330	2,189	0,692
II	10	7,640	4,025	1,273
III	10	7,410	3,454	1,092
IV	10	7,600	3,449	1,091

El análisis de la diferencia entre estos 2 grupos de medidas, como - ya se desprende de la gráfica, muestra:

P U N T O :	0	I	II	III	IV
PROBABILIDAD :	0,550	0,025	0,001	0,001	0,001

encontrando que el punto 0 no indica diferencias, que por el contrario -

G R A F I C A   X I I   ( 6 días postfractura )



son importantes en torno a la zona de fractura. Respecto a los valores anteriores se repiten los datos, motivo por el cual no entramos en su análisis concreto.

En el 6º día postfractura hemos analizado 4 grupos de 3 animales, - sólo en 8 fueron válidas las medidas realizadas con el periostio, y en 12 las realizadas sin él, estando recogidas en la TABLA XI. La representación de las medidas en mV. en el gráfico XII, nos indican, ya que los valores registrados sin periostio son muy débiles, lo que confirma también la gráfica X en la que vemos, que en esta primera fase al 6º día se alcanzan los valores más bajos de la primera semana postfractura.

La elaboración estadística es:

<u>PUNTO</u>	<u>TAMAÑO MUESTRA</u>	<u>MEDIA</u>	<u>DESVIACION TIPICA</u>	<u>ERROR TIPICO</u>
0	8	-1,950	2,693	0,952
I	8	0,800	2,544	0,899
II	8	2,137	2,095	0,741
III	8	2,637	2,368	0,837
IV	8	2,887	2,328	0,823
0	12	-2,733	1,724	0,498
I	12	1,517	2,077	0,600
II	12	3,858	2,199	0,635
III	12	4,392	2,392	0,691
IV	12	4,783	2,574	0,743

Donde el primer grupo de valores representa las medidas con periostio y el segundo las medidas sin periostio. En este grupo, igual que en el anterior, no hemos analizado las diferencias de los puntos entre sí dentro de cada grupo, y sí las diferencias punto a punto entre las distintas poblaciones, encontrando que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los dos. Si los comparamos ahora con los anteriores, ya que hemos visto que las medidas sin periostio eran las más bajas registradas, encontramos:

**TABLA XII Registros efectuados a los siete días postfractura .-**

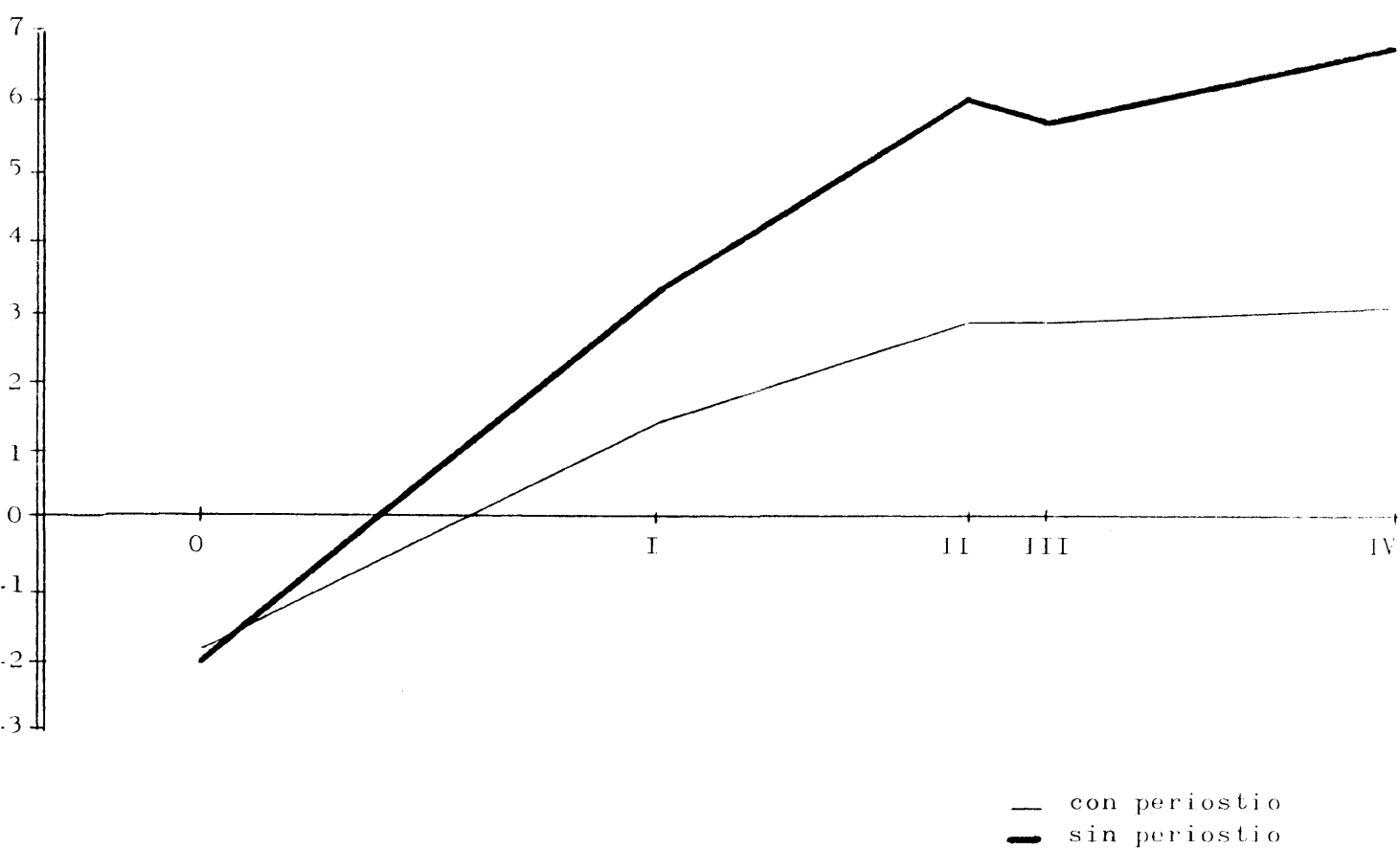
PUNTO :	<u>C O N   P E R I O S T I O</u>	<u>S I N   P E R I O S T I O</u>
	-1,6. -0,1. -1,1. -1,6. -5,8. -1,3. -3,7. -1,2.	1,7. -0,8. -3,8. -9,1. -2,3. -1,2. 0,4.
I	1,3. 2,0. 1,7. -1,3. 4,4. 0,7. 0,8. 1,7.	6,1. 8,9. 5,0. 5,5. 4,4. -2,4. -8,6. 0,8. 3,8. 8,9.
II	1,4. 2,4. 3,1. 2,9. 4,4. 2,5. 1,7. 4,3.	6,4. 0,5. 3,0. 7,5. 8,4. -4,0. 1,6. 2,9. 12,1. 11,8.
III	1,4. 2,2. 3,1. 3,3. 4,6. 2,6. 1,6. 4,3.	6,0. 10,5. 2,5. 7,4. 4,4. 8,5. 2,8. 11,6. 11,5.
IV	1,5. 2,3. 3,4. 3,5. 4,9. 2,1. 2,1. 4,2.	6,4. 10,5. 3,1. 7,3. 8,2. 8,8. 11,5. 12,4.

**TABLA XIII Valores derivados el décimo día tras la fractura .-**

PUNTO :	<u>C O N   P E R I O S T I O</u>	<u>S I N   P E R I O S T I O</u>
0	0,1. -1,2. -2,6. -0,5. 2,4. -0,4. -0,8. -0,2. -1,0. -1,5. -2,5. -0,8. -3,5. -1,4.	-3,7. -2,0. -6,5. -1,0. 0,8. -0,5. 0,4. -3,0. -0,5. -1,8. -0,6. -0,1. -1,7. -0,6.
I	0,6. 2,7. -0,3. 1,3. 6,3. 4,5. 0,2. 2,0. 1,3. 1,9. -0,1. 0,0. 3,8. 0,2.	-0,3. 2,5. 3,4. 1,3. 6,7. -5,3. 2,7. 1,8. 4,3. 5,4. 1,0. 2,1. 3,5. 1,5.
II	0,9. 5,0. 0,0. 1,3. 9,1. 4,8. 0,4. 3,4. 2,1. 3,1. 1,5. 2,4. 4,7. 1,5.	5,0. 6,4. 6,4. 3,3. 7,7. 6,0. 4,7. 4,4. 4,6. 7,5. 2,2. 4,8. 6,9. 2,5.
III	1,7. 5,0. 0,0. 1,3. 9,2. 5,0. 1,3. 3,0. 2,8. 2,5. 1,8. 3,0. 5,5. 2,1.	5,0. 8,9. 7,0. 3,5. 7,5. 6,1. 4,4. 4,1. 4,4. 6,2. 2,4. 5,3. 7,2. 2,6.
IV	1,6. 5,1. 0,8. 1,6. 9,3. 5,3. 1,7. 5,6. 3,8. 3,2. 2,5. 3,0. 6,2. 2,9.	5,6. 8,1. 7,7. 3,4. 7,6. 5,9. 7,0. 6,7. 7,1. 7,4. 3,1. 5,7. 7,3. 5,2.



G R A F I C A   X I I I   ( 7 días postfractura )



P U N T O:	0	I	II	III	IV
PROBABILIDAD :	0,350	0,001	0,001	0,001	0,001
	0,250	0,001	0,001	0,001	0,001
	0,550	0,001	0,005	0,001	0,010
	0,015	0,015	0,001	0,005	0,010

Todo referido a las medidas sin periostio. La primera fila es la diferencia entre el 6º día postfractura y las medidas sobre el hueso íntegro. La segunda fila representa las diferencias entre la fractura inmediata y el grupo que estamos analizando. La tercera fila nos muestra que existen diferencias significativas entre el segundo y sexto día postfractura en las zonas en torno al trazo, pero al contrario que en otras medidas, es más -- significativa para el punto I que para el punto IV. Lo mismo sucede al -- comparar el 5º día con el 6º que viene reseñado en la cuarta fila. Estos datos parecen indicar que las oscilaciones que hemos registrado en estos -- días tras la fractura, tienen un significado estadísticamente válido.

Pasamos ahora a analizar el séptimo día postfractura. En este grupo se incluyen 12 animales de los cuales se perdieron 2. En 8 se efectuaron medidas con el periostio intacto y en 10 tras la extirpación del mismo. Los valores están recogidos en la TABLA XII y su representación aparece en la gráfica XIII y la primera elaboración estadística donde las medias vienen expresadas en milivoltios es:

<u>PUNTO</u>	<u>TAMAÑO MUESTRA</u>	<u>MEDIA</u>	<u>DESVIACION TIPICA</u>	<u>ERROR TIPICO</u>
0	8	-1,950	1,702	0,602
I	8	1,350	3,447	0,512
II	8	2,750	1,016	0,359
III	8	2,787	1,094	0,387
IV	8	2,925	1,097	0,388

<u>PUNTO</u>	<u>TAMAÑO MUESTRA</u>	<u>MEDIA</u>	<u>DESVIACION TIPICA</u>	<u>ERROR TIPICO</u>
0	7	-2,114	3,220	1,217
I	10	3,200	5,039	1,594
II	10	5,960	4,856	1,536
III	10	5,680	5,560	1,760
IV	10	6,630	4,764	1,506

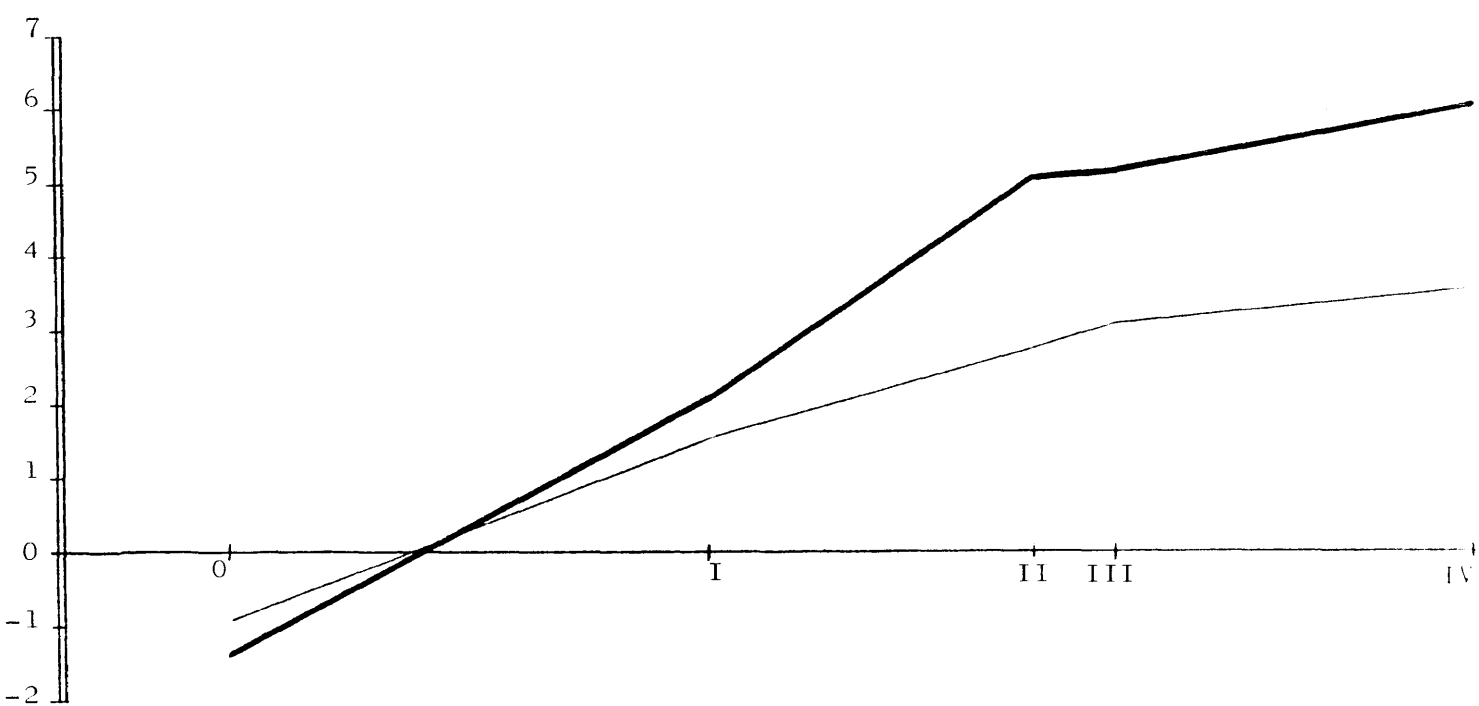
Llama la atención aquí la gran dispersión de los valores en los registros realizados sin periostio. El análisis probabilístico en el espacio nos indica para las medidas con periostio, que el punto 0 es diferente a los demás al 99% de certeza, en tanto que los otros no muestran diferencias - claras entre sí. Tras desperiostizar encontramos que el punto 0 discrepa significativamente de los puntos II, III y IV, pero no con el punto I. - Los demás, por la gran dispersión antes citada, no muestran diferencias - significativas entre sí.

La comparación de los dos grupos no presenta diferencias estadísticamente significativas entre sí, aunque la representación gráfica de las - medias no muestre éstas tan cercanas como en el día 6.

En relación con los registros previos encontramos respecto al con - trol las diferencias antes citadas, y como indica el gráfico IX hay una di - ferencia al 99% de los puntos II, III y IV en las medidas con periostio y en relación al 4º día, que es el momento en que se alcanza el voltaje míni - mo en las medidas realizadas con el periostio.

Superada esta primera fase de análisis diario, el registro siguien - te se efectuó el décimo día postfractura. Se incluyeron 15 animales de -- los que murió 1, siendo los 14 restantes útiles para los registros con/sin periostio. La totalidad de los mismos aparece en la TABLA XIII cuya elabo - ración estadística es:

G R A F I C A    XIV    ( 10 días postfractura )



con periostio  
sin periostio

<u>PUNTO</u>	<u>TAMAÑO MUESTRA</u>	<u>MEDIA</u>	<u>DESVIACION TIPICA</u>	<u>ERROR TIPICO</u>
0	14	-0,957	1,328	0,355
I	14	1,693	1,879	0,502
II	14	2,800	2,320	0,620
III	14	3,107	2,264	0,605
IV	14	3,671	2,226	0,595
0	14	-1,421	1,846	0,493
I	14	2,143	2,670	0,714
II	14	5,100	1,677	0,448
III	14	5,257	1,855	0,496
IV	14	6,179	1,498	0,400

La media expresada en milivoltios y su representación aparece en la gráfica XIV. Vemos allí que los valores con y sin periostio se diferencian poco entre sí, y que existe una diferencia entre el punto 0 y los demás con periostio, y para el I y los demás sin periostio. Estas diferencias significativas aparecen en la siguiente distribución:

PUNTO :	0	I	II	III	IV
PROBABILIDAD:	0,450	0,650	0,001	0,001	0,001

es decir, que en torno a la zona de fractura el periostio sigue marcando diferencias en las medidas de este grupo, lo cuál es seguramente más claro -- por el mayor tamaño de la muestra y su menor dispersión.

En relación con los datos previos, las medidas conservando el periostio no muestran diferencias significativas con las medidas control, mientras que las diferencias son estadísticamente significativas al 99% tras extirpar el periostio para los puntos I, II, III y IV. Esta diferencia es la misma -- comparando la fractura inmediata y el 10º día con periostio, y al extirpar éste el índice 0,001 se reduce a las tres últimas posturas de medida. La gráfica IX nos muestra que sin desperiostizar tanto en el séptimo día como en el décimo día, los valores aumentan en voltaje y se acercan a los fisiológicos.

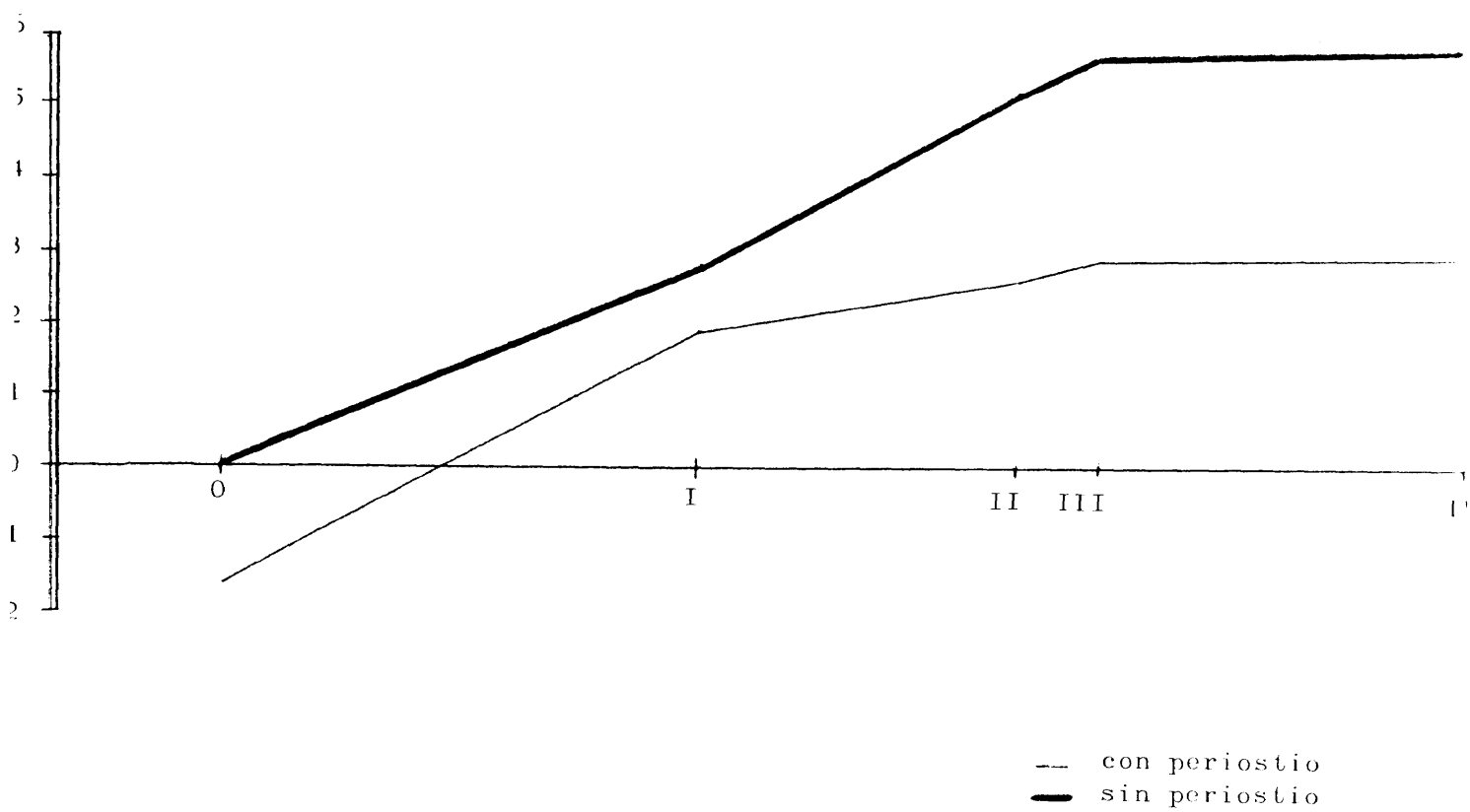
**TABLA XIV** Datos obtenidos el quinceavo día tras la fractura .-

PUNTO :	<u>C O N   P E R I O S T I O</u>	<u>S I N   P E R I O S T I O</u>
0	-1,0. -3,0. 1,4. -4,0. -2,8. -2,4. 1,7. -3,2.	-1,6. -2,0. -0,5. 0,2. 0,6. 0,6. 0,6. 1,9. 0,6.
I	1,9. 0,6. 2,8. 0,1. 0,4. 1,4. 4,7. 4,8.	1,4. 2,3. 3,7. 1,8. 3,1. 0,5. 4,5. 6,4. 6,3.
II	4,1. 3,0. 2,6. 0,8. 1,3. 2,2. 3,7. 4,4.	5,6. 5,4. 8,3. 4,0. 4,1. 1,7. 6,3. 7,0. 9,2.
III	3,3. 3,6. 3,1. 1,0. 1,8. 2,2. 4,4. 5,0.	6,5. 6,4. 8,6. 5,0. 4,5. 2,5. 6,1. 6,9. 10,0.
IV	3,5. 3,7. 3,5. 1,5. 2,3. 2,4. 4,3. 2,7.	6,6. 6,4. 8,4. 6,2. 4,4. 2,8. 6,2. 6,9. 10,3.

**TABLA XV** Registros en el 21 día postfractura .-

PUNTO :	<u>C O N   P E R I O S T I O</u>	<u>S I N   P E R I O S T I O</u>
0	2,4. -3,1. 0,5. -0,6. -1,1. -3,2.	1,1. -2,4. -2,8. -2,3. -4,5.
I	2,2. 1,2. 1,6. 1,8. 0,6. 0,5.	2,3. 7,0. 0,9. 0,1. -0,2. 0,0.
II	2,3. 7,3. 1,6. 2,3. 1,1. 2,9.	3,4. 7,0. 5,5. 2,0. 4,7. 2,2.
III	2,5. 8,7. 2,1. 2,3. 1,5. 2,8.	3,5. 7,5. 5,8. 2,4. 4,8. 2,4.
IV	2,8. 8,7. 2,6. 2,9. 2,1. 3,3.	3,5. 7,5. 5,9. 2,3. 5,0. 2,8.

G R A F I C A   X V   ( 15 días postfractura )



cos con los cuales no aparecen diferencias significativas desde el punto de vista estadístico, lo que no sucede para los valores sin periostio como vemos en la gráfica X.

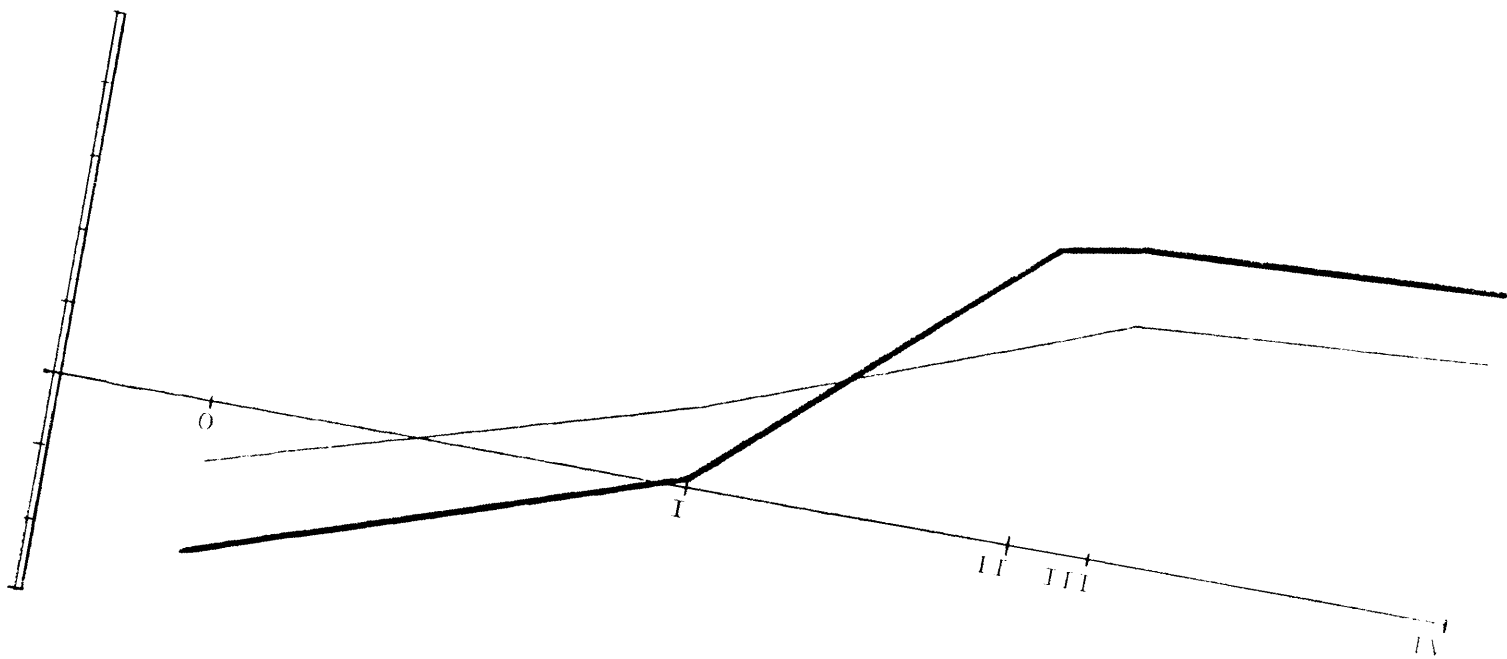
El siguiente grupo se dejó evolucionar hasta el quinceavo día post - fractura con un total de 9 animales, de los cuales se perdió 1 por muerte . Los 8 restantes sirvieron para hacer registros con/sin periostio, ya que , en esta fase el callo es mucho más estable, como al décimo día, y las dificultades técnicas para conservar el periostio son menores. La TABLA XIV recoge todos los datos cuya elaboración aparece en el siguiente cuadro y donde la media se expresa en mV. El primer grupo representa las medidas con y el segundo grupo los registros sin periostio. Su representación aparece en la gráfica XV.

<u>PUNTO</u>	<u>TAMAÑO MUESTRA</u>	<u>MEDIA</u>	<u>DESVIACION TIPICA</u>	<u>ERROR TIPICO</u>
O	8	- 1,650	1,958	0,692
I	8	1,987	1,740	0,615
II	8	2,675	1,214	0,429
III	8	2,975	1,249	0,442
IV	8	2,925	0,851	0,301
O	8	-0,075	1,143	0,404
I	8	2,887	1,763	0,623
II	8	5,225	1,910	0,675
III	8	5,762	1,669	0,590
IV	8	5,887	1,580	0,559

El análisis en el espacio nos muestra que para las medidas con periostio sólo hay diferencias significativas entre el punto 0 y los demás. Al desperiostizar las diferencias del punto 0 se conservan, y el punto I se diferencia de los puntos II, III y IV con los siguientes coeficientes de probabilidad: 0,025 0,015 y 0,001 respectivamente. Al comparar los dos grupos entre sí la diferencia aparece:



GRÁFICA XVI (21 días postfractura)



— con periostio  
— sin periostio

P U N T O :	0	I	II	III	IV
PROBABILIDAD :	0,150	0,350	0,015	0,001	0,001
	0,015	0,450	0,025	0,025	0,025
	0,150	0,055	0,001	0,001	0,001
	0,350	0,025	0,001	0,001	0,001
	0,450	0,055	0,015	0,001	0,001

Las cuatro últimas filas son comparaciones en el tiempo. En la primera observamos que no hay una diferencia clara, conservando el periostio, entre los valores fisiológicos y los del quinceavo día postfractura, en tanto -- que la diferencia es clara tras extirpación del mismo, en especial para -- los puntos más distales. La 3ª fila nos indica la significación estadística de la comparación entre la fractura inmediata y los 15 días conservando el periostio. La última fila nos compara el grupo en estudio con los valores obtenidos en el 4º día postfractura conservando el periostio, que como vemos en la gráfica IX era el momento de menor voltaje en las medidas supraperiostales.

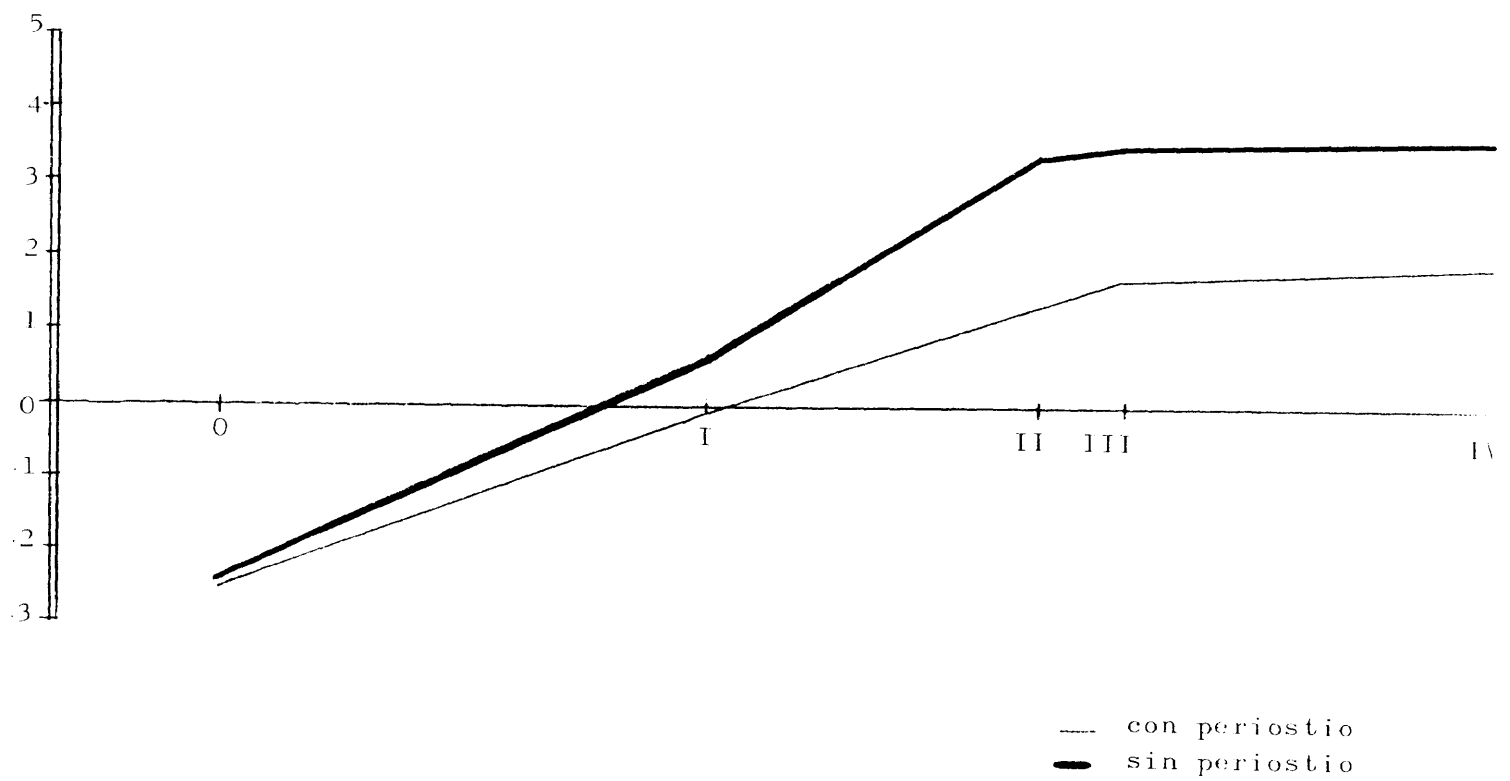
Pasamos ahora al grupo de animales analizados a los 21 días postfractura, en el cual hemos incluido 6 ratas todas útiles para la elaboración de datos que aparecen recogidos en la TABLA XV y cuya representación aparece en el gráfico XVI. La elaboración estadística muestra en el primer grupo los registros con periostio y en el segundo sin él, con la media expresada en mV.

<u>PUNTO</u>	<u>TAMAÑO MUESTRA</u>	<u>MEDIA</u>	<u>DESVIACION TIPICA</u>	<u>ERROR TIPICO</u>
0	6	-0,800	1,896	0,774
I	6	1,183	0,664	0,271
II	6	2,817	2,042	0,833
III	6	3,250	2,423	0,989
IV	6	3,633	2,250	0,919

TABLA XVI                      Valores derivados al mes postfractura .-										
PUNTO :	<u>C O N   P E R I O S T I O</u>					<u>S I N   P E R I O S T I O</u>				
0	-2,2.	-0,5.	-4,1.	-2,4.	-5,7.	-2,0.	-3,0.	-0,7.	-0,4.	-2,3.
	-1,3.	-2,4.				-3,8.	-5,2.			
I	0,5.	3,2.	-0,4.	0,5.	-3,5.	-1,0.	1,1.	1,7.	1,9.	0,4.
	-0,4.	-0,8.				3,6.	-2,6.			
II	1,3.	4,1.	0,8.	0,9.	3,3.	1,3.	3,1.	3,5.	4,3.	3,8.
	0,1.	0,4.				5,5.	2,9.			
III	1,4.	4,5.	1,4.	1,2.	3,2.	1,9.	3,3.	3,4.	4,5.	4,1.
	0,4.	0,5.				5,1.	2,8.			
IV	1,6.	4,6.	1,9.	1,4.	3,7.	2,4.	3,7.	3,4.	4,8.	4,1.
	0,5.	0,6.				4,9.	3,1.			

TABLA XVII                      Valores derivados a los 90 días de la fractura .-										
PUNTO :	<u>C O N   P E R I O S T I O</u>					<u>S I N   P E R I O S T I O</u>				
0	5,8.	-3,7.	-2,5.	-0,4.	-2,1.	-2,4.	-0,9.	-0,2.	-3,5.	-0,9.
I	7,4.	-3,5.	0,1.	3,6.	2,9.	-0,9.	2,2.	0,7.	2,2.	8,8.
II	10,2.	2,7.	0,6.	4,2.	8,1.	0,7.	8,4.	5,4.	5,8.	10,6.
III	8,5.	0,0.	0,8.	4,9.	0,1.	1,2.	7,9.	4,9.	4,8.	2,1.
IV	7,5.	0,4.	1,3.	4,9.	0,7.	1,5.	9,4.	4,9.	5,0.	3,3.

G R A F I C A XVII (30 días postfractura)



<u>PUNTO</u>	<u>TAMAÑO MUESTRA</u>	<u>MEDIA</u>	<u>DESVIACION TIPICA</u>	<u>ERROR TIPICO</u>
O	6	-2,18	0,626	0,279
I	6	0,197	0,268	0,109
II	6	4,133	1,348	0,603
III	6	4,366	0,705	0,315
IV	6	4,633	0,101	0,045

El análisis de la gráfica indica que ambos grupos tienen valores relativamente cercanos entre sí. Su estudio comparativo señala que por la amplia dispersión de las medidas con periostio, no existen diferencias significativas entre ellos. El estudio de las gráficas y el análisis comparativo de los valores muestra que para las medidas con periostio no hay diferencia entre el grupo que nos ocupa y el grupo control a cuyos valores se acerca, existiendo una diferencia clara con los valores obtenidos inmediatamente tras la fractura. La gráfica X sugiere que a partir del séptimo día postfractura los valores registrados son más o menos estables, siempre por debajo de los valores control e inmediatos a la fractura.

Hemos de considerar ahora el grupo de animales estudiados a los 30 días postfractura en cuyo grupo se incluían inicialmente 9 animales, de los que murieron 2 durante la anestesia. Los 7 animales restantes dieron medidas útiles tanto en el grupo con periostio como sin él. La gráfica XVII da la imagen de los valores referidos en la TABLA XVI y cuya elaboración estadística nos muestra los dos grupos de datos, de los cuales el primero da los valores con periostio y las medias expresadas en mV.

<u>PUNTO</u>	<u>TAMAÑO MUESTRA</u>	<u>MEDIA</u>	<u>DESVIACION TIPICA</u>	<u>ERROR TIPICO</u>
O	7	-2,571	1,593	0,602
I	7	-0,100	1,811	0,685
II	7	1,457	1,416	0,535
III	7	1,729	1,408	0,532
IV	7	1,957	1,418	0,536

<u>PUNTO</u>	<u>TAMAÑO MUESTRA</u>	<u>MEDIA</u>	<u>DESVIACION TIPICA</u>	<u>ERROR TIPICO</u>
O	7	-2,414	1,567	0,592
I	7	0,671	1,822	0,689
II	7	3,414	1,225	0,463
III	7	3,500	1,011	0,382
IV	7	3,671	0,838	0,317

Si analizamos en el espacio estos datos, encontramos para los registros con periostio que la probabilidad para la diferencia 0 - I es 0,025 y al 99% - con el resto de los puntos. Los demás no muestran una diferencia estadística clara entre ellos. Para los registros sin periostio el punto 0 muestra un coeficiente 0,015 en relación con el punto I, que es similar para la relación entre los puntos I y II. El 0 con II, III y IV, y el I con III y IV muestra un coeficiente de diferencia del 0,001 al analizarlos con el test de Student. Los demás puntos no muestran variaciones significativas entre sí. La comparación de estas muestras entre sí, nos indican que no hay una diferencia muy significativa entre ambas.

El análisis comparativo con los datos previos nos sugiere en las gráficas IX y X, que aún dentro de un valor uniforme, a los 30 días aparece un nuevo mínimo que es más marcado para los registros hechos sin periostio. -- Su análisis comparativo desde el punto de vista estadístico es:

P U N T O:	0	I	II	III	IV
PROBABILIDAD :	0,650	0,001	0,001	0,001	0,001
	0,450	0,015	0,001	0,001	0,001
	0,850	0,001	0,015	0,001	0,015
	0,055	0,001	0,005	0,015	0,015

De estos datos, la fila primera es la comparación con la medición de control. La segunda fila con el registro inmediatamente tras la fractura. La tercera fila compara el segundo con el treinta día, y la última fila éste con el -- quinto día postfractura, siempre en los grupos de medidas sin periostio. Es

<u>PUNTO</u>	<u>TAMAÑO MUESTRA</u>	<u>MEDIA</u>	<u>DESVIACION TIPICA</u>	<u>ERROR TIPICO</u>
0	7	-2,414	1,567	0,592
I	7	0,671	1,822	0,689
II	7	3,414	1,225	0,463
III	7	3,500	1,011	0,382
IV	7	3,671	0,838	0,317

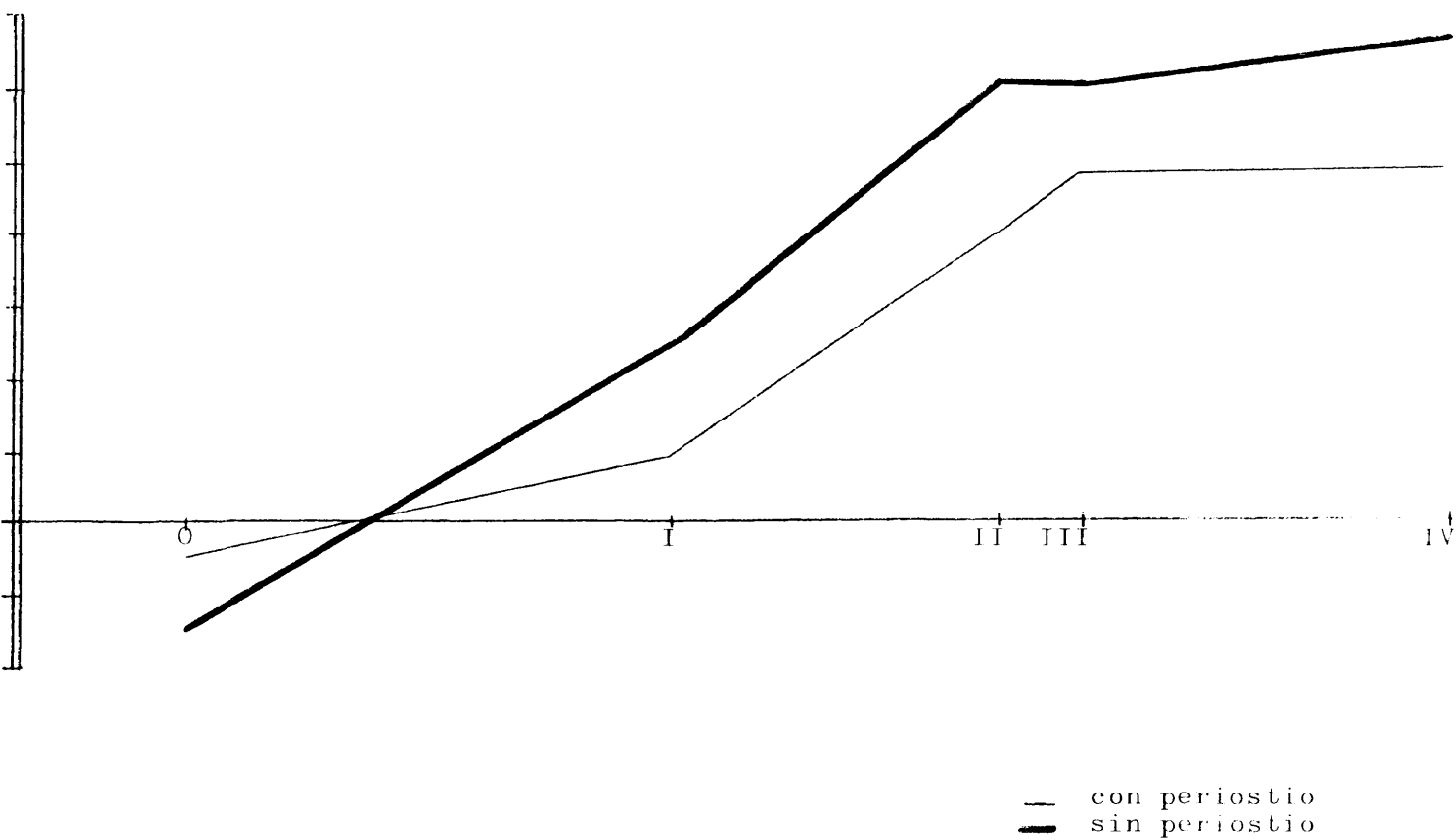
Si analizamos en el espacio estos datos, encontramos para los registros con periostio que la probabilidad para la diferencia 0 - I es 0,025 y al 99% - con el resto de los puntos. Los demás no muestran una diferencia estadística clara entre ellos. Para los registros sin periostio el punto 0 muestra un coeficiente 0,015 en relación con el punto I, que es similar para la relación entre los puntos I y II. El 0 con II, III y IV, y el I con III y IV muestra un coeficiente de diferencia del 0,001 al analizarlos con el test de Student. Los demás puntos no muestran variaciones significativas entre sí. La comparación de estas muestras entre sí, nos indican que no -- hay una diferencia muy significativa entre ambas.

El análisis comparativo con los datos previos nos sugiere en las gráficas IX y X, que aún dentro de un valor uniforme, a los 30 días aparece un nuevo mínimo que es más marcado para los registros hechos sin periostio. -- Su análisis comparativo desde el punto de vista estadístico es:

P U N T O:	0	I	II	III	IV
PROBABILIDAD :	0,650	0,001	0,001	0,001	0,001
	0,450	0,015	0,001	0,001	0,001
	0,850	0,001	0,015	0,001	0,015
	0,055	0,001	0,005	0,015	0,015

De estos datos, la fila primera es la comparación con la medición de control. La segunda fila con el registro inmediatamente tras la fractura. La tercera fila compara el segundo con el treinta día, y la última fila éste con el -- quinto día postfractura, siempre en los grupos de medidas sin periostio. Es

G R A F I C A XVIII (90 días postfractura)





te análisis parece indicar que a los 30 días los potenciales eléctricos no han vuelto aún a la normalidad.

El último grupo analizado es el de los animales con una evolución - de tres meses de su callo de fractura, al cuál podemos considerar a priori inmerso en pleno proceso de remodelado óseo. En este grupo son válidos 5 de los 6 animales empleados. La recopilación de sus datos aparece en la - TABLA XVII, y en la gráfica XVIII la representación de las medidas de los - valores de los diferentes puntos expresados en mV cuya elaboración esta - dística es:

<u>PUNTO</u>	<u>TAMAÑO MUESTRA</u>	<u>MEDIA</u>	<u>DESVIACION TIPICA</u>	<u>ERROR TIPICO</u>
0	5	-0,540	3,296	1,474
I	5	0,900	4,039	1,806
II	5	4,020	4,670	2,088
III	5	4,800	4,014	1,795
IV	5	4,940	3,892	1,741
0	5	-1,500	1,231	0,551
I	5	2,540	3,262	1,459
II	5	6,080	3,324	1,487
III	5	6,080	3,643	1,629
IV	5	6,760	4,063	1,817

Lo que resalta en estas dos últimas series es la gran dispersión de los valores recogidos en comparación con el tamaño de la muestra, lo que les restará significación en el momento de compararlas con otras series y entre - sí, de forma que no hay diferencias estadísticamente significativas entre ambas. La comparación con los valores fisiológicos tampoco muestra ningún grado de diferencia significativa. Por tanto a los 90 días, quizás por dicho factor de dispersión, los valores se aproximan a los registrados en el hueso idemne.

En las gráficas IX y X hemos recogido la evolución a lo largo de -

PC  
1

FI  
1

1  
1

2  
1

3  
1

4  
1

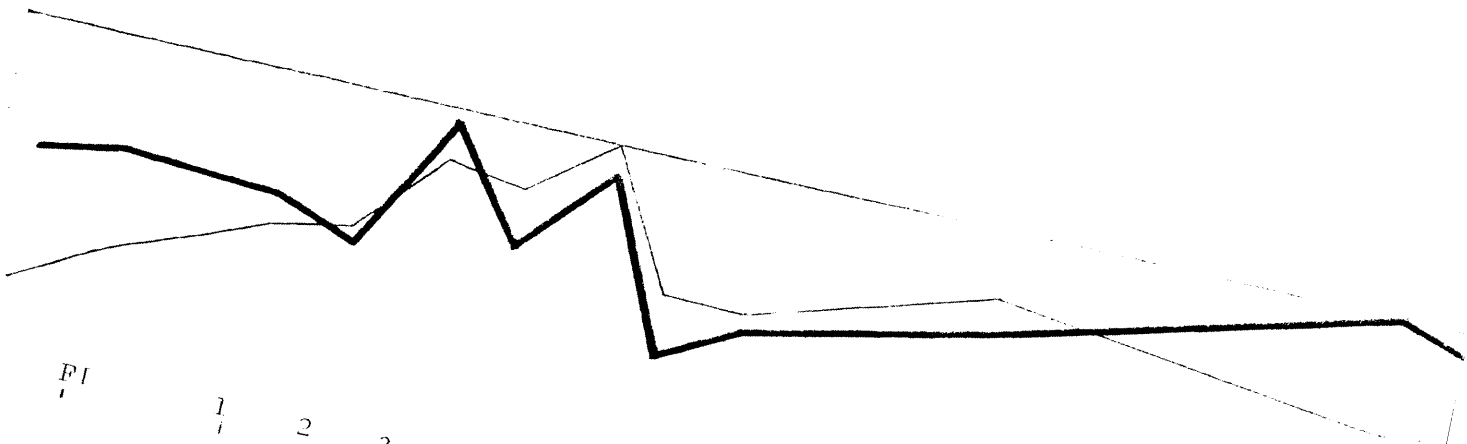
5  
1

6  
1

7  
1

10  
1

15  
1

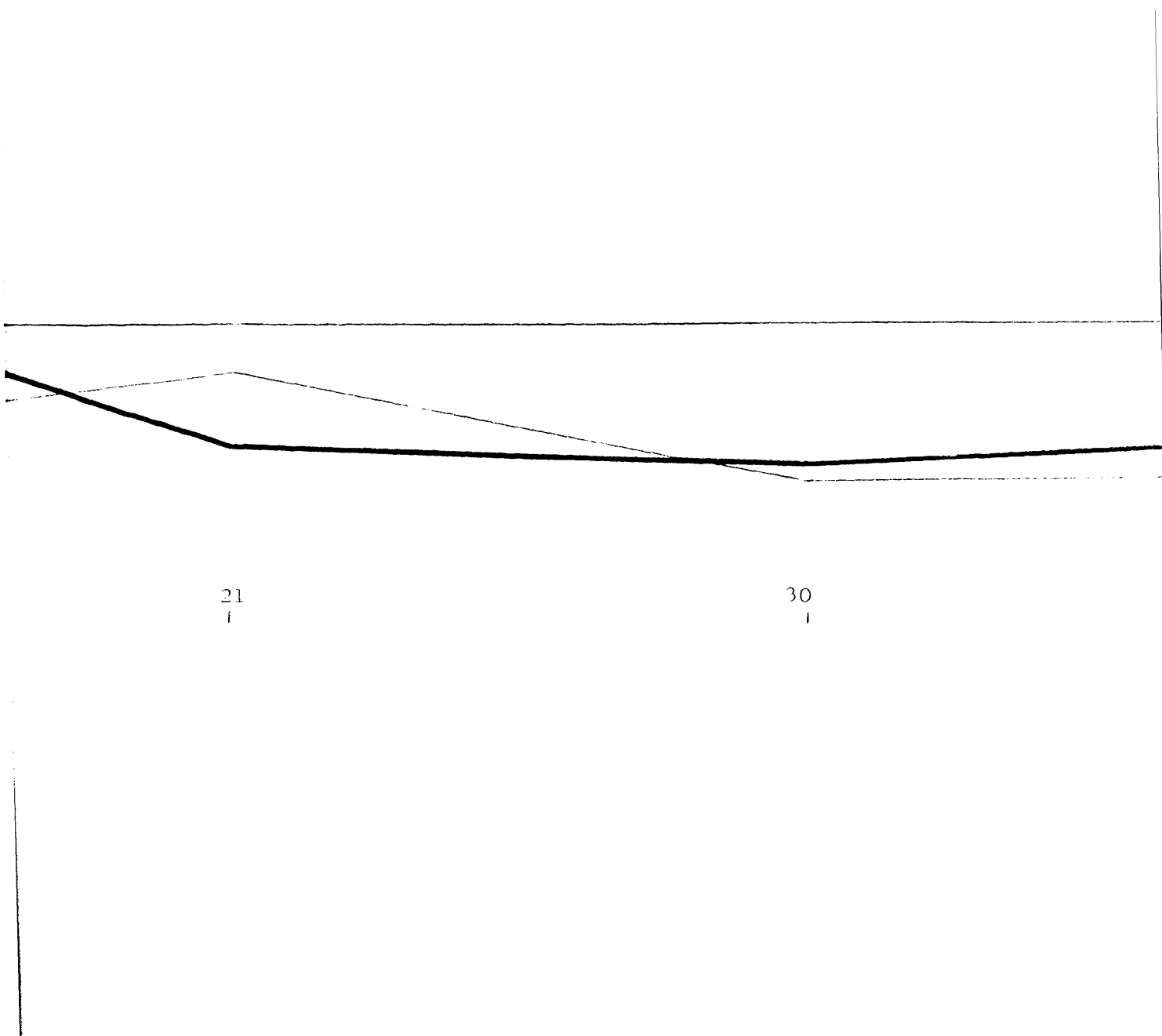


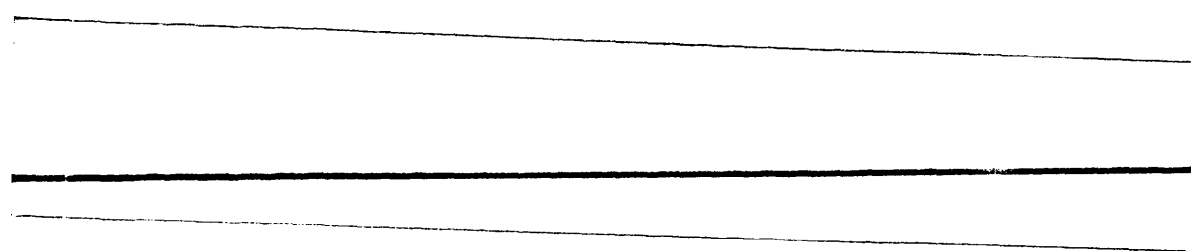
G R A F I C A   X I X

PUNTO -O-   EN   EL   TIEMPO .-

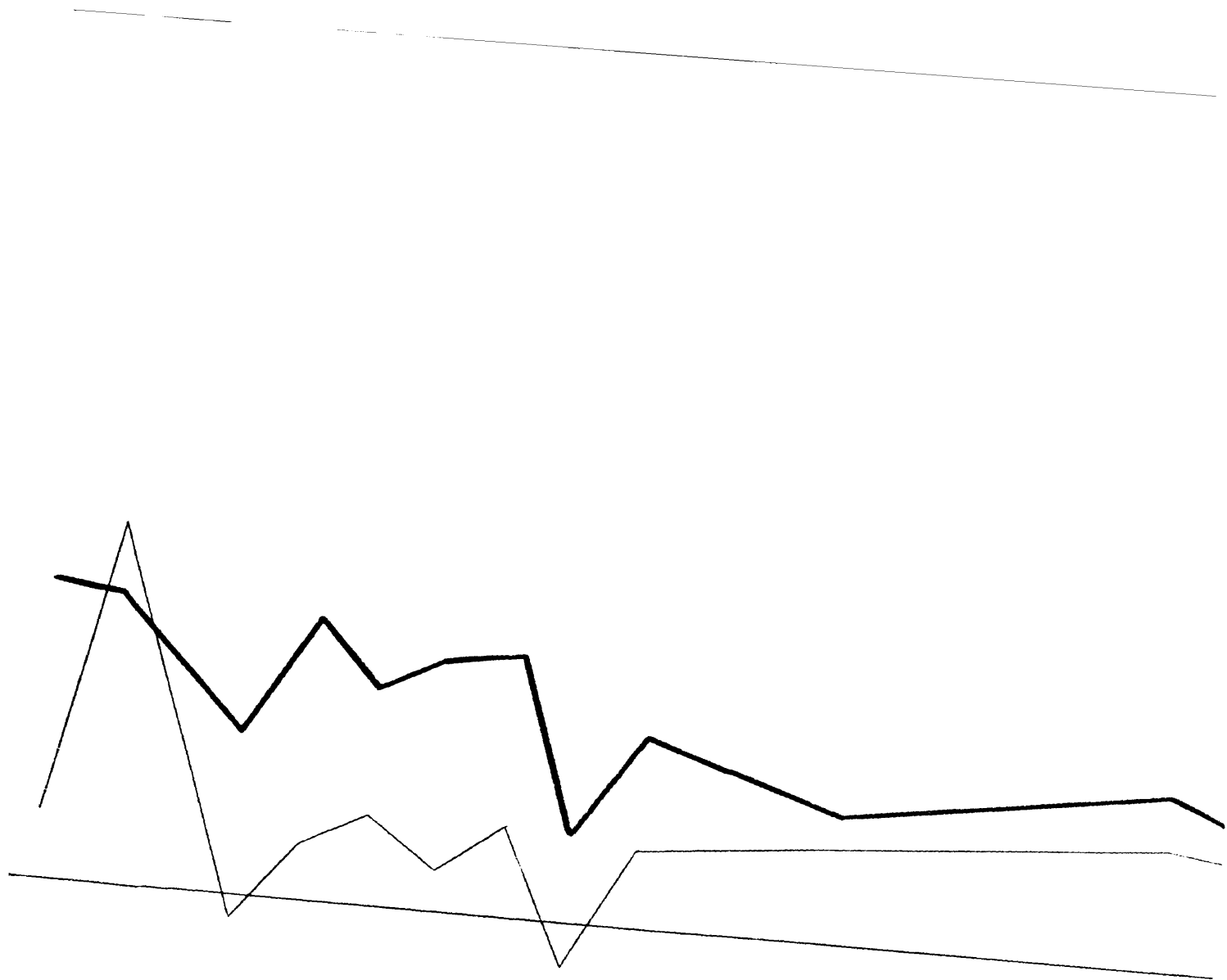
21  
i

30  
i





— con periostio  
● sin periostio



PC

FI

1

2

3

4

5

6

7

10

15

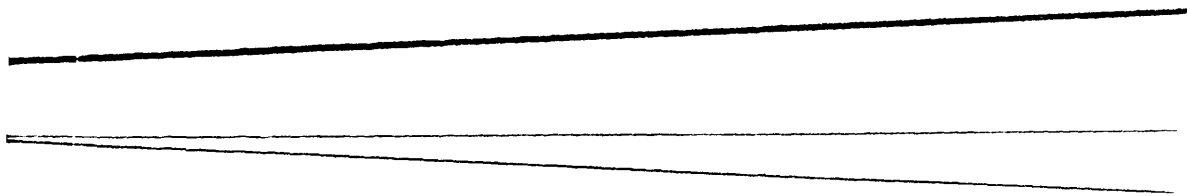
G R A F I C A   XX

PUNTO -I- EVOLUCION EN EL TIEMPO



21  
I

30  
I



90  
I

— con periostio  
— sin periostio

los tres meses del experimento, de los valores medios de las tomas realizadas en los diferentes puntos sobre el periostio y tras su separación de la superficie ósea. En ellas vemos que en los primeros momentos tras la rotura ósea, se producen unas claras oscilaciones de los valores registrados - que se estabilizan a partir del sexto día en las medidas con , y a partir del séptimo día en las medidas sin periostio.

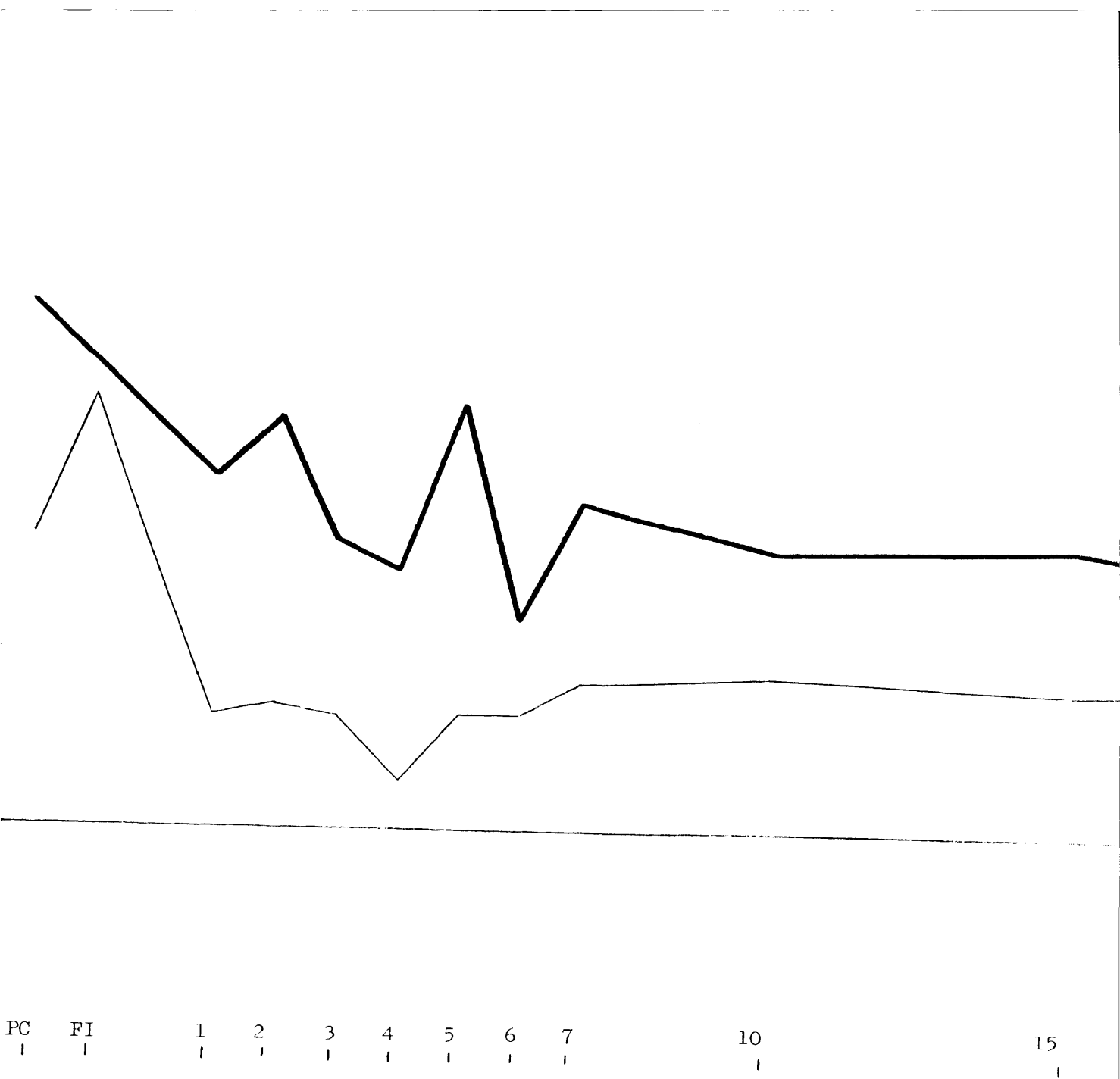
En los gráficos XIX a XXIII hemos representado la evolución en el tiempo de los registros de cada uno de los puntos con y sin periostio. En estos gráficos es posible ver que los potenciales sufren una serie de oscilaciones, como ya hemos señalado, y que estas oscilaciones son bastante similares en los registros hechos con o sin el periostio, siendo estos últimos siempre de mayor voltaje. Tiene interés ahora hacer un análisis estadístico de estos valores, y al margen del hecho previamente.

Al estudiar el punto 0 , vemos ya en la gráfica, como primera aproximación, que sus valores no varían mucho entre sí, ni a lo largo del tiempo. Al hacer el análisis de cada una de las muestras hemos ido viendo que, en efecto, la presencia del periostio no modifica significativamente los valores registrados. Su evolución en el tiempo nos muestra una aproximación a 0 mV entre el 2º y 6º día postfractura. Con una probabilidad del 0,001 hemos encontrado diferencias entre el registro sobre el hueso idemne, y el registro a los 4, 5, 10 y 21 días conservando el periostio. -- Tras desperiostizar la tibia, no hemos encontrado por el contrario diferencias significativas entre el punto 0 en el hueso idemne y los días sucesivos a la fractura en ningún caso; ni en la comparación de los registros en los diferentes días entre sí, tanto con/sin periostio.

La gráfica XX nos indica el devenir del punto I cuyos registros muestran tras la oscilación citada, más amplia en los primeros días en los que la diferencia entre los grupos con y sin periostio es así mismo más marcada.--

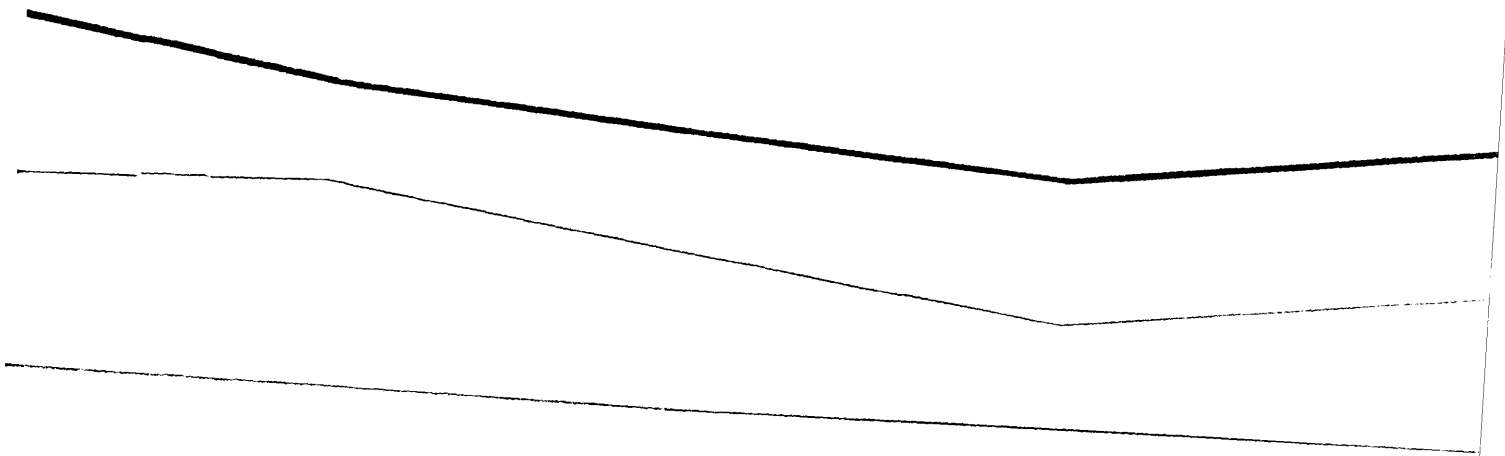
A partir del séptimo día se estabilizan los potenciales y la diferencia debida al periostio se hace menor para aumentar de nuevo en el 90 día. El análisis estadístico previo nos ha demostrado que en unos grupos





G R A F I C A    XXI

PUNTO -II- EVOLUCION EN EL TIEMPO

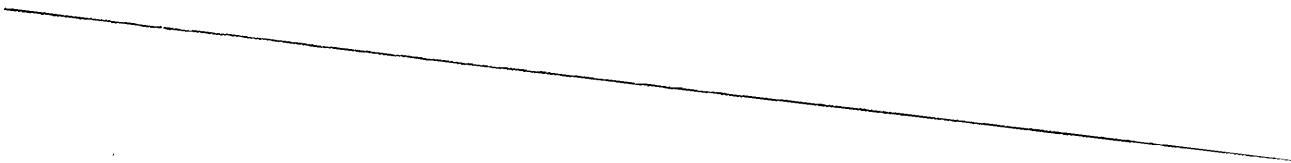
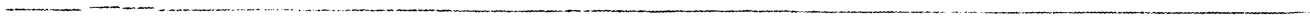
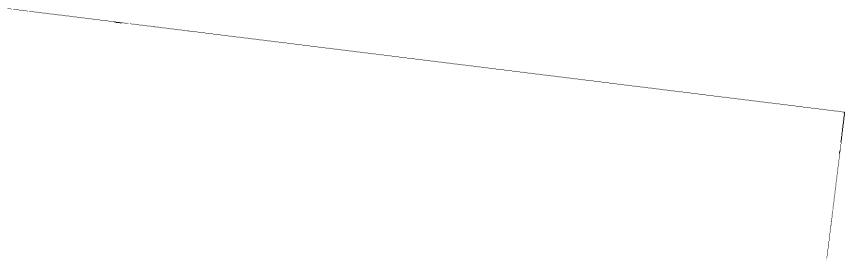


21

I

30

I



— con periostio  
— sin periostio

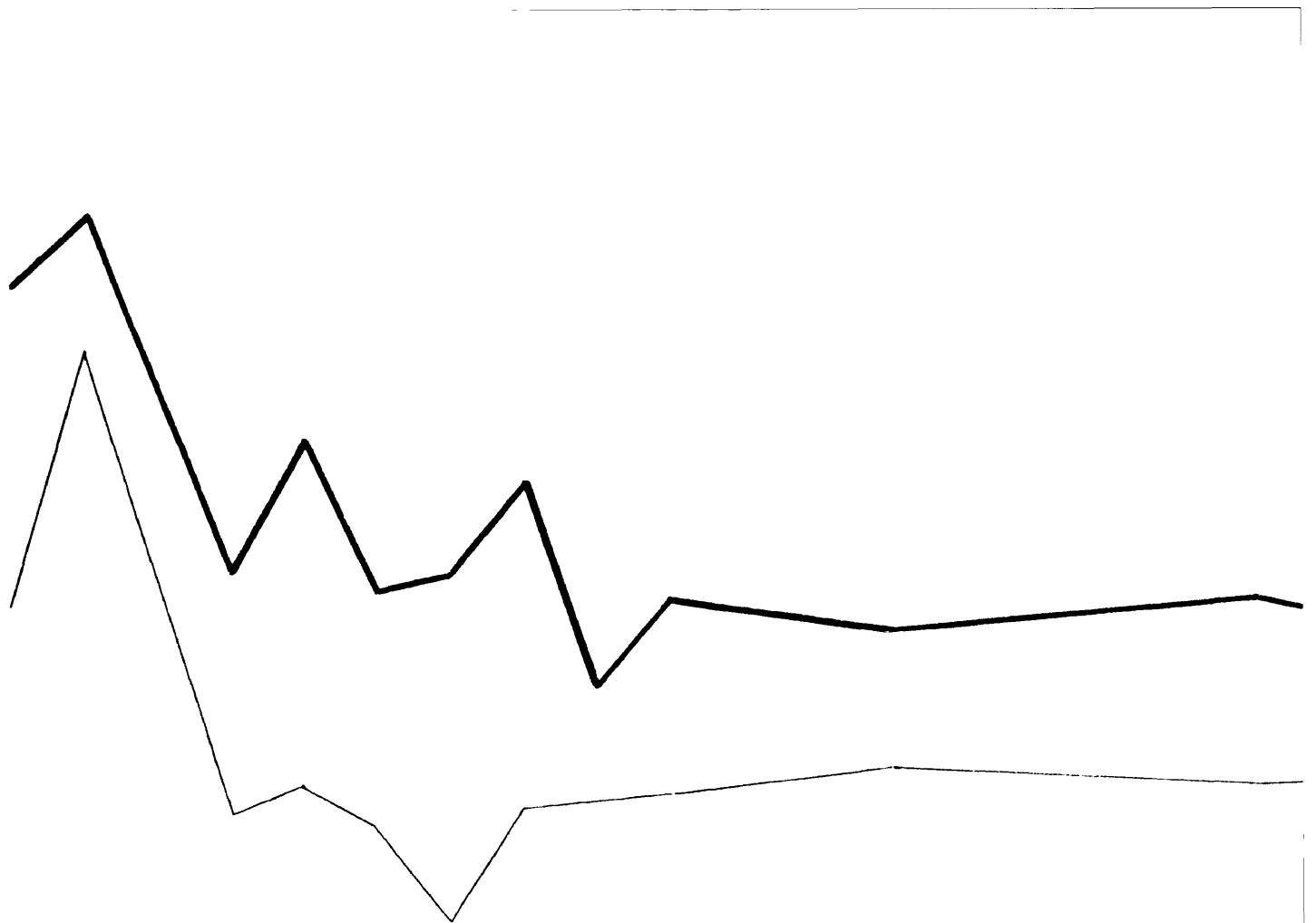
90  
1

la diferencia era estadísticamente significativa y en otro no. Conservando el periostio al 99% de certeza, encontramos diferencias entre el hueso control e inmediatamente después de la fractura, en tanto que los demás puntos, debido a la dispersión de los valores, no presentan diferencias estadísticamente válidas. Por el contrario, el registro de este punto inmediatamente después de la fractura, muestra diferencias claras con las medidas efectuadas a lo largo del desarrollo del callo, en especial al día siguiente y a los 2, 4, 10 y 30. Al mes la significación es 0,001. Los días intermedios tienen un valor en torno al 75%.

Si analizamos los valores del punto I tras desperiostizar la tibia, encontramos una diferencia clara entre el hueso idemne, los 6 y 10 días con una significación del 99%, que disminuye al 75% para el primer día postfractura. La comparación del punto I medido inmediatamente después de la fractura, muestra su máxima diferencia, como indica la gráfica con los registros de los días 5, 6, y 10 así como con los 30 días, que alcanza una significación del 85%.

El punto II tiene especial interés con el siguiente al presentar las determinaciones del voltaje existente en torno al foco de fractura. La gráfica XXI nos indica la evolución de sus valores que muestran unas oscilaciones más amplias así como una clara caída en relación a los niveles previos.

El análisis estadístico, ya esbozado antes, nos presenta una diferencia significativa de los valores del punto II en el hueso intacto y tras la fractura, con un máximo de significación al 99% para el 4º día postfractura y para el 30 día, en tanto que al 90 día no existen diferencias válidas estadísticamente. Si en lugar de comparar los datos obtenidos conservando el periostio, lo hacemos con los obtenidos tras desperiostizar, observamos que el nivel de significación de la diferencia aumenta a un coeficiente del 0,001 para los días 3, 4, 6, 10 y 30, y del 85 y 75% respectivamente para los días 1 y 7 postfractura como indica la gráfica, para al 90 día no mostrar diferencias válidas.



PC  
1

FI  
1

1  
1

2  
1

3  
1

4  
1

5  
1

6  
1

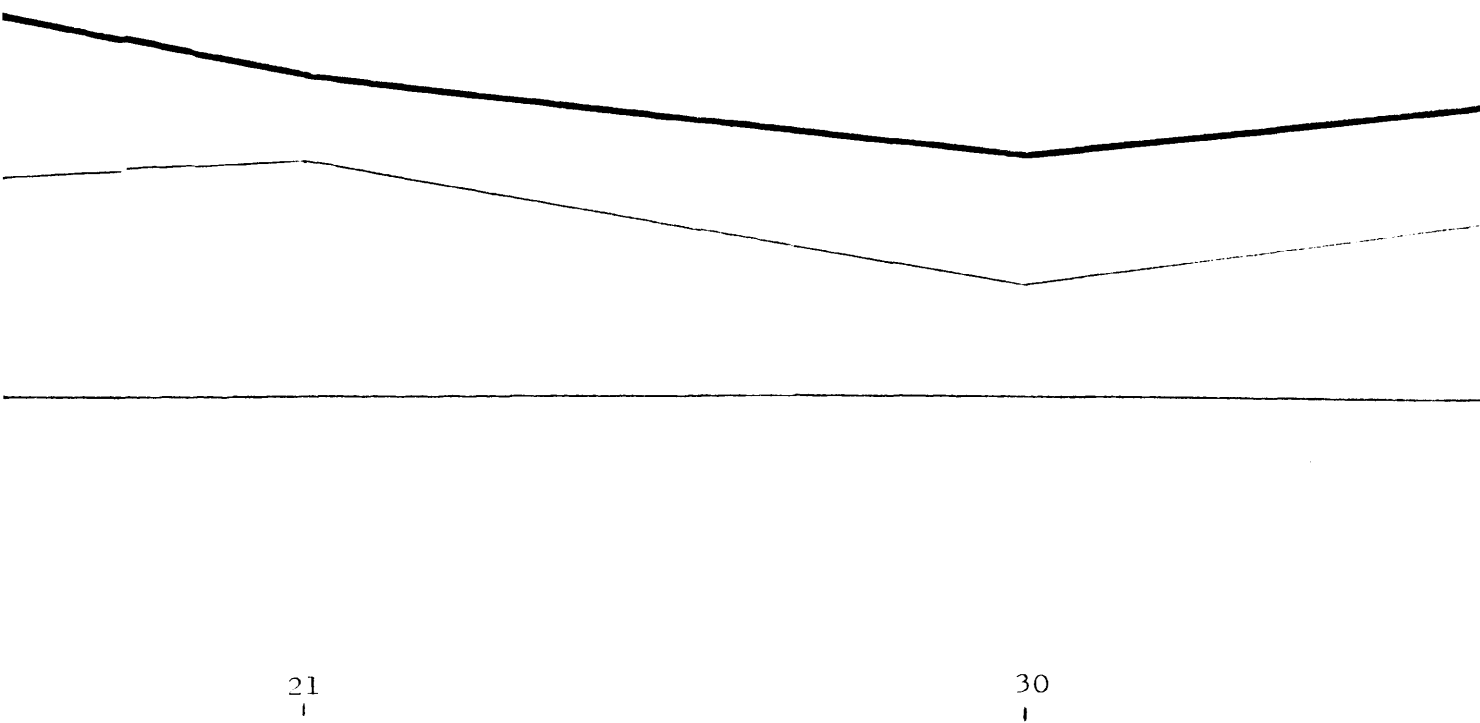
7  
1

10  
1

15  
1

G R A F I C A   XXII

PUNTO -III-   EVOLUCION EN EL TIEMPO



— con periostio

— sin periostio

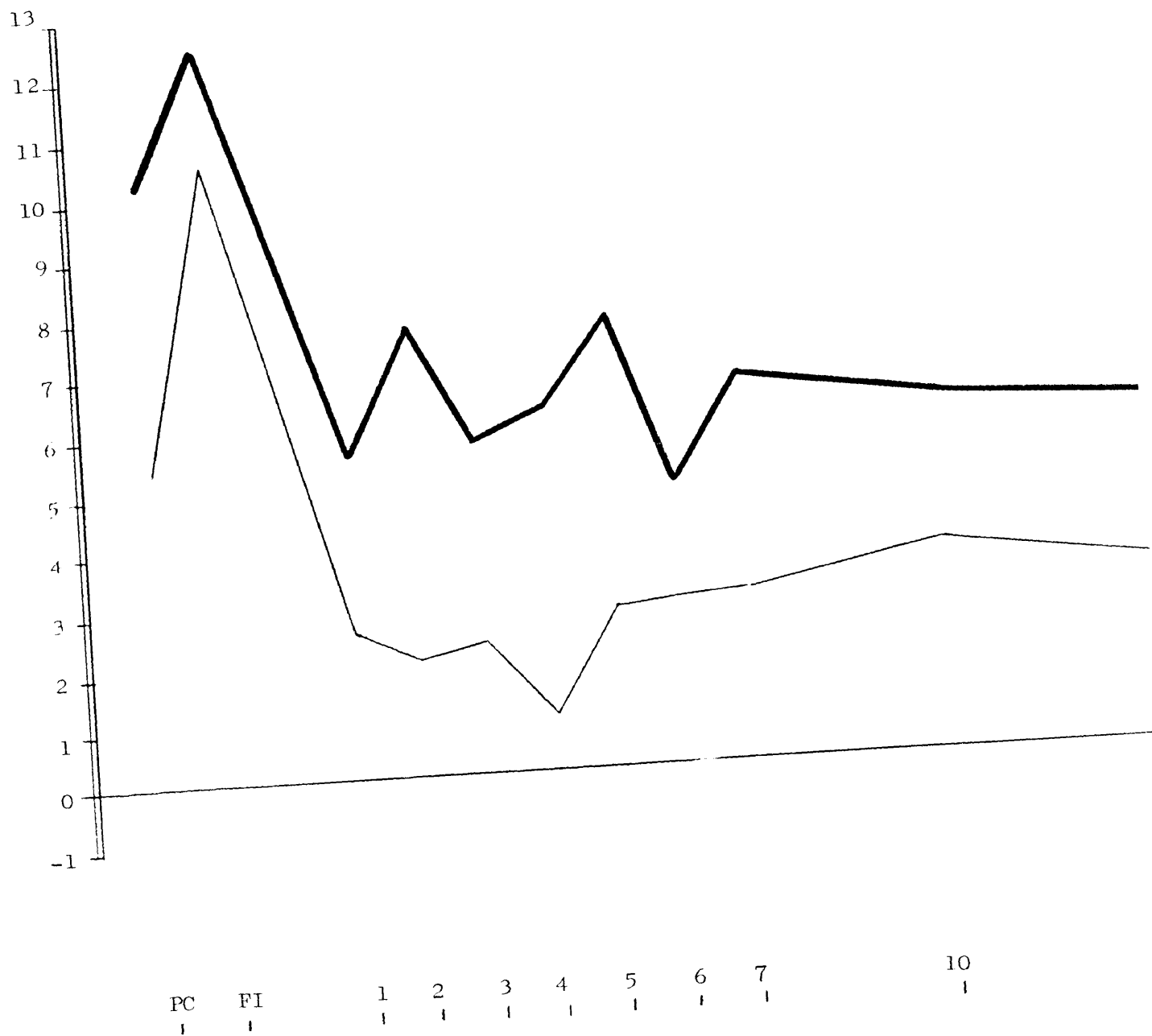
La diferencia entre el valor obtenido inmediatamente después de la - fractura y el registrado a lo largo de la evolución del callo, es altamente significativa para el punto II conservando el periostio, de forma que, sal vo para el 90 día, el coeficiente de probabilidad es 0,001. Este disminuye mucho al comparar los valores sobre hueso desperiostizado, lo que confirma la imagen de la gráfica. Con 99 de certidumbre hay una diferencia entre el registro inmediato y los días 6, 10 y 30 postfractura, y del 75% para el 3º y 4º día. Por otro lado, para las medidas sin periostio existen diferen -- cias válidas entre el día 1 y el 6, el 1 y el 30, el 2 y el 6, el 2 y el 30, el 5 y el 6 y el 5 y el 30, así como el 10 y el 30 día, es decir, los vér tices de los valores registrados y representados en la gráfica XXI.

Corresponde estudiar ahora el punto III de nuestra hipótesis. La -- evolución de las diferencias de potencial registradas a su nivel, las encon tramos plasmadas en la gráfica XXII, en la que reaparecen unas característi cas similares a las halladas en el devenir del punto II, pero que al contra rio que en éste, al comienzo del análisis se encuentran más próximas las -- curvas para establecer el periostio después de una diferencia mayor entre - ellas.

Al margen de los estudios estadísticos previos, en los que uno de -- los datos más sobresalientes era el agrupamiento de los valores de los pun- tos II, III y IV, que no mostraban diferencias estadísticamente significati vas entre sí, en ninguna de las series en las que buscábamos dicha diferen- cia. Si comparamos ahora los datos del hueso control y los registrados en la evolución del callo, encontramos que, conservando el periostio, todas -- las medidas muestran una diferencia con un nivel de significación del 75% - respecto a la medida sobre hueso idemne. Tras la desperiostización el coe- ficiente aumenta al 0,001 para todos los días analizados, salvo el 2º y 5º día postfractura, como indica también la gráfica. En este grupo, al contra rio que en las medidas supraperiósticas, incluso a los 90 días se conserva una significación del 0,015.

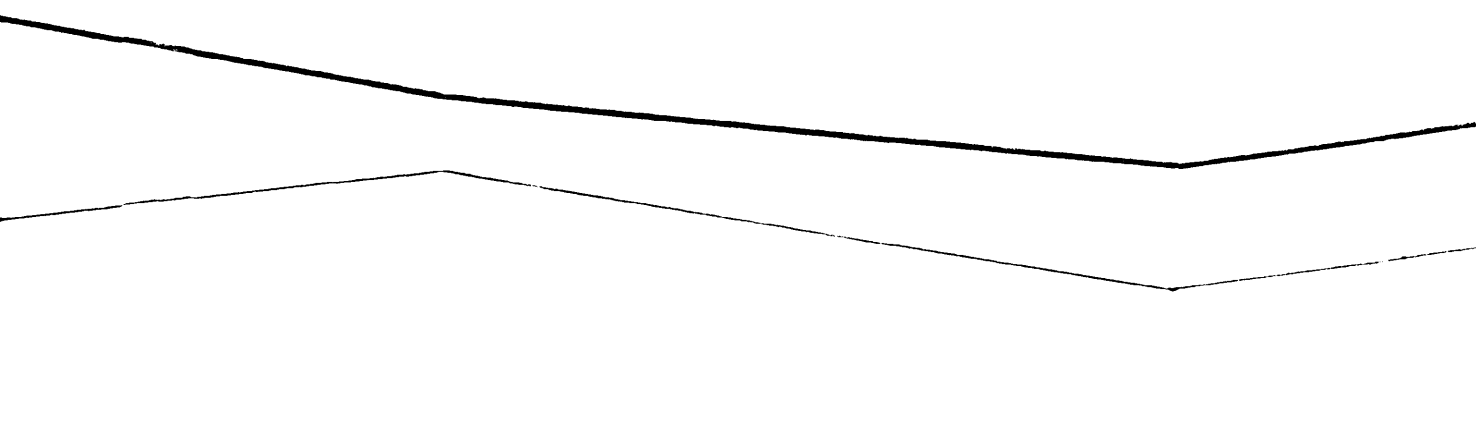
La comparación del registro inmediato a la fractura y los de los días





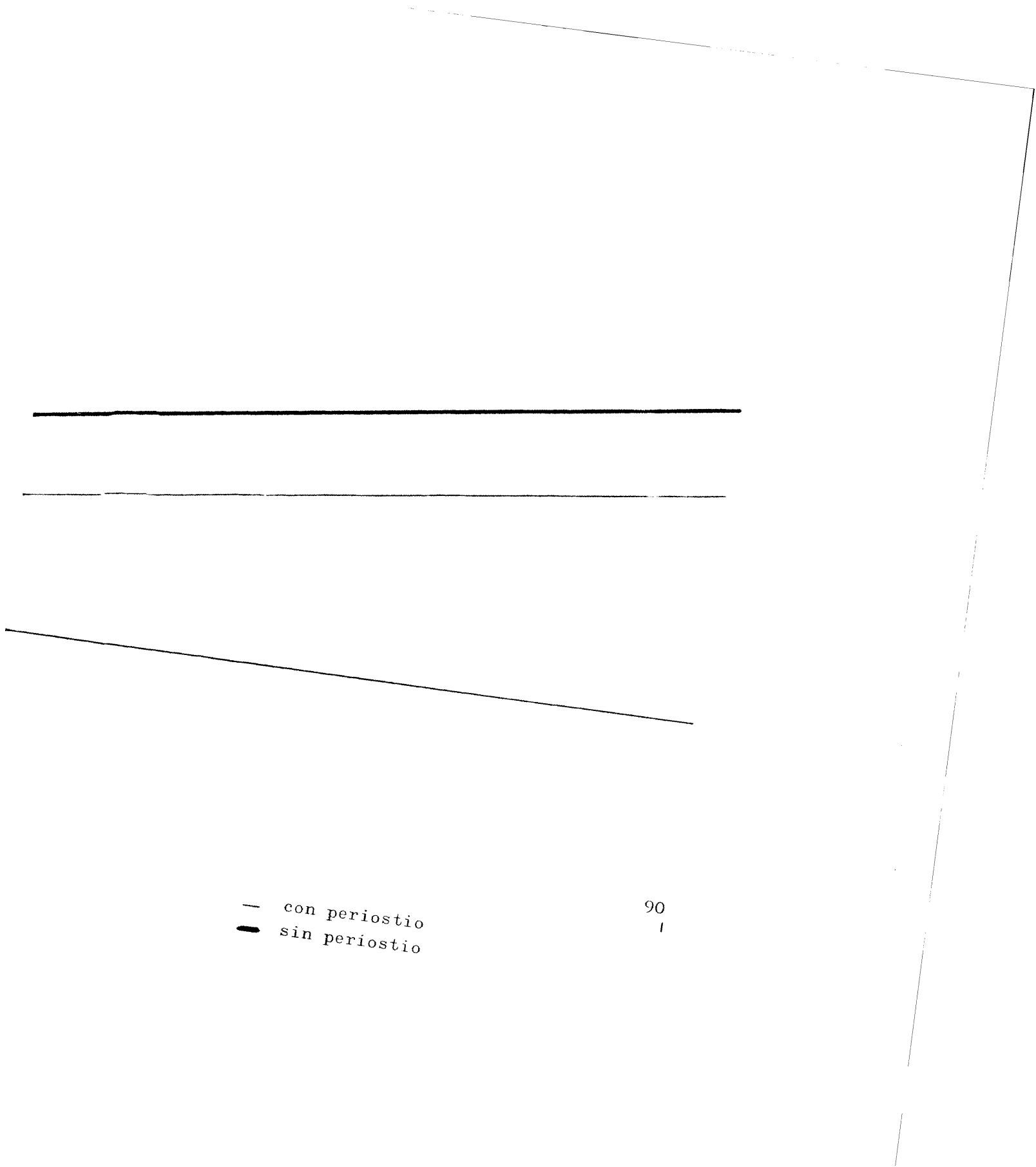
R A F I C A   XXIII

- EVOLUCION EN EL TIEMPO



21  
|

30  
|



sucesivos, muestra para el punto III, conservando el periostio, un coeficiente de significación de 0,001 para todos los puntos, valor que se repite en las medidas hechas tras desperiostizar la tibia.

El análisis de la gráfica XXII sugiere que las medidas del punto III sobre el periostio en los días siguientes a la fractura, son bastante similares entre sí y sólo puede tener interés conocer si existen diferencias significativas entre el registro del 4º día postfractura y los demás días, diferencia que, efectivamente, aparece para los días 7, 10 y 15, con un valor del 99% para el primero y último.

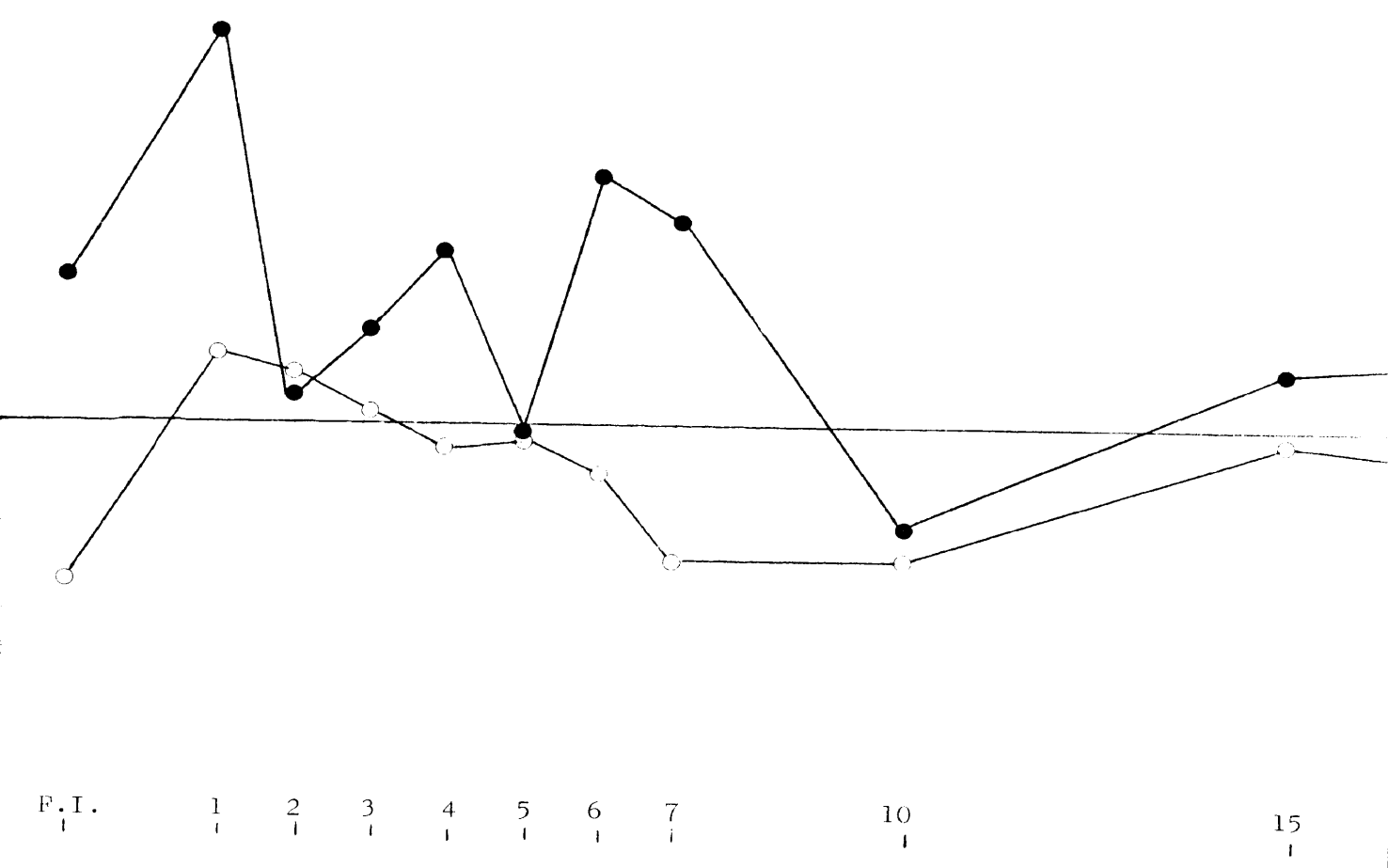
Para la segunda serie, sólo los vértices máximos de las oscilaciones, es decir, los días 2 y 5 respecto al 6º, muestran diferencias significativas.

El gráfico XXIII nos da la imagen de la evolución de los valores medios registrados a nivel del punto IV con y sin periostio y, como ya habíamos augurado, muestra una imagen muy similar a la encontrada para el punto III. No entramos a considerar la significación estadística de los diversos valores registrados, ya que son en todo superponibles a los análisis realizados para el punto III.

Pasamos ahora a considerar los datos del punto V, como hemos denominado a las medidas efectuadas cambiando las posturas de los electrodos, de forma que el control se localizó sobre el vértice del fragmento proximal y el del registro sobre el extremo proximal del fragmento distal, como aparece en la fig. D. El análisis estadístico de sus valores viene recogido en el cuadro siguiente con la media expresada en mV. Todos los datos se recogieron tras desperiostizar el hueso. En el gráfico XXIV recogemos la evolución en el tiempo del valor medio de los registros del punto V.

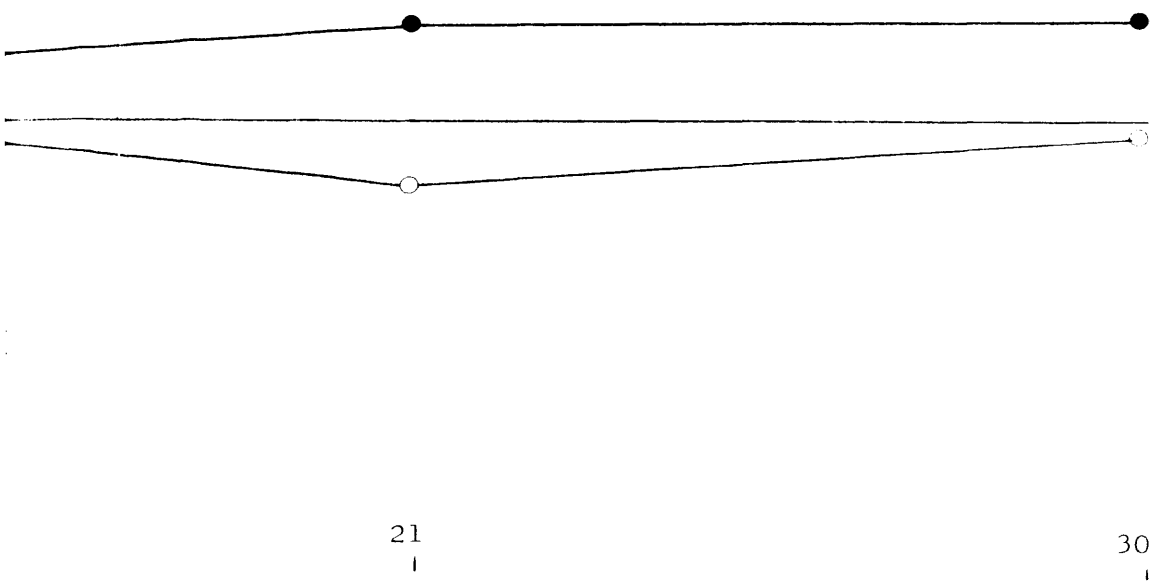
G R A F I C A   X A

EVOLUCION DEL PUNTO V E



XIV

EN EL TIEMPO



● PUNTO -V-

○ DIFERENCIA ENTRE PUNTOS III - IV

<u>DIA</u>	<u>TAMAÑO MUESTRA</u>	<u>MEDIA</u>	<u>DESVIACION TIPICA</u>	<u>ERROR TIPICO</u>
0	15	1,1333	2,422	0,647
1	8	2,847	2,648	1,001
2	10	0,270	0,399	0,133
3	8	0,725	1,386	0,524
4	7	1,028	0,118	0,048
5	7	-0,014	0,444	0,181
6	8	1,837	0,784	0,296
7	6	1,500	1,630	0,729
10	6	-0,716	2,205	0,986
15	8	0,350	0,068	0,025
21	6	0,700	0,252	0,113
30	7	0,771	0,799	0,326

Como vemos en la gráfica XXIV las medidas del punto V son en su mayoría de signo positivo y muestran unas oscilaciones similares a las que habíamos encontrado en nuestro análisis previo, como hemos señalado anteriormente, pero manteniéndose estas diferencias hasta el 15 día postfractura.

En el mismo esquema hemos representado los valores que resultaban de la diferencia entre las medias del punto II y el punto III, a lo largo de los mismos días postfractura, en los registros sin periostio y cuyos valores expresados en milivoltios son:

<u>D I A</u>	<u>MEDIA</u>	<u>D I A</u>	<u>MEDIA</u>
0	-2,786	6	-0,534
1	0,455	7	+0,280
2	-0,658	10	-0,157
3	-0,563	15	-0,537
4	-1,300	21	-0,233
5	0,230	30	-0,086

Vemos que las oscilaciones primeras son menos acentuadas y que, salvo los días 1, 5, y 7, los registros son negativos. Sobre la significación de esta diferencia entraremos en la discusión.

## II - HALLAZGOS MORFOLOGICOS



## HALLAZGOS MORFOLOGICOS

Nos corresponde ahora hacer una descripción de los hallazgos morfológicos registrados en las tibias y costillas extraídas de los animales sacrificados tras el registro de los potenciales, y que nos servirán para establecer una posible correlación entre la evolución del callo y los potenciales derivados. Esto implica que no entremos en un análisis profundo de los datos histológicos, y que no busquemos el origen y devenir de cada una de las estirpes celulares que intervienen en la elaboración del callo, que no estudiemos su invasión vascular mas que como un fenómeno más, y que no nos ocupemos de su mecanismo de calcificación. Por ello hemos renunciado a un estudio con microscopía electrónica de transmisión de las piezas analizadas y al marcado celular. Como ya señalamos en el capítulo de mate - rial y métodos, la base del estudio son las tibias y costillas fracturadas y teñidas, tras su elaboración apropiada, con las técnicas de hematoxilina y eosina -H.E., Van Gieson -V.G. y tricrómico de Masson -TC.

La tibia y costilla normal tienen una estructura como corresponde a un hueso diafisario de mamífero inferior, que se caracteriza por un menor número de osteonas en las corticales.

Encontramos una representación de la cortical en las figuras 1 y 2, en las que podemos apreciar a pequeños aumentos una zona de la región diafisaria media de una costilla de rata. Vemos en la fig. 1-a una zona de la cortical, regular, con una estructura laminar y un número relativamente escaso de osteocitos de morfología fusiforme, dispuesto con su eje mayor - paralelo a la cortical y con una distribución uniforme entre la superficie endostal y la periostal. En la figura 1-b apreciamos un detalle de la mis ma cortical a mayor aumento, en la que podemos discernir mejor la disposición de los osteocitos en su laguna.

En la figura 2-a encontramos la imagen del periostio de la costi-

lla en el animal adulto que no ha sufrido ningún tipo de estímulo que le - haga proliferar. En la figura 2-b apreciamos la imagen normal de la capa endostal unicelular que limita internamente las corticales.

Las figuras 3-a y b, nos reproducen los diferentes aspectos que -- ofrece la cortical de la tibia del mismo animal adulto. En la fig. 3-a po demos ver que la separación entre la capa circunferencial externa y el es- pesor de la cortical es más claro, pero sin un desarrollo muy marcado de - los sistemas haversianos. Los espacio vasculares aparecen estructurados - en la diáfisis de una manera similar a como lo reproducimos en la figura - 3-b.

Por los datos de Tonna, etc., sabemos que la respuesta celular co - mienza a manifestarse a las 16 horas de la fractura, por lo que el estudio morfológico lo hemos comenzado a las 24 horas de la lesión, a la vez que hemos efectuado un registro de los potenciales eléctricos en ese momento.

En la figura 4 podemos apreciar el aspecto de las inmediaciones -- del trazo de fractura, a las 24 horas de producida ésta.

Los extremos corticales están rodeados por el hematoma fig. 4-a, el cuál presenta una estructura relativamente celular en la vecindad del tra- zo, y en sus partes periféricas muestra una disposición de la fibrina de - orientación perpendicular a las corticales como se aprecia en las figs. 4-b y 4-c. A mayor aumento se visualiza la fibrina dispuesta en una zona cen- tral en torno a la cuál hay un acúmulo de hematies que conservan más o me - nos su estructura.

Hay un infiltrado de células redondas de núcleo grande central y de escasas células fusiformes con prolongaciones de su citoplasma, que pueden corresponder a fibroblastos jóvenes figs. 5-a y b.

En la fig. 4-a vemos el infiltrado del canal medular por el hemato- ma que ocupa una parte muy importante del mismo. Se encuentra limitado ha

cia la medular sana por un acúmulo celular similar al descrito más arriba, y que en ambos puntos se acompaña de células de la reacción inflamatoria - aguda: neutrófilos, etc. En esta fase no es discernible claramente una -- reacción proliferativa medular.

La reacción periostal a las 24 horas está escasamente desarrollada y presenta diferentes aspectos según el punto de la diáfisis en la que se la estudie. En la figura 6-a vemos que las células se estratifican en varias capas. En contacto con la antigua cortical adquiere mayor tamaño, se separan entre sí y se rodean de una sustancia fundamental de apariencia fi brosa de orientación preponderante paralela a la cortical. Al alejarnos - del trazo de fractura desaparece esa matriz, pero las células en contacto con la cortical son más grandes fig. 6-b.

Las células adoptan a lo largo de toda la cortical una disposición estratificada, que en su región externa está formada por células más pequeñas y más próximas entre sí, que se separan en la vecindad de la cortical donde adquieren un aspecto claramente fusiforme y se rodean de una matriz fibrosa. En la fig. 6-b es posible ver la penetración de un vaso en la - cortical.

El aspecto de las corticales no muestra detalles característicos -- que las diferencien de los datos descritos anteriormente para las corticales idemnes.

•

A los dos días de producida la fractura su aspecto general aparece en la figura 7-a , resalta la gran extensión del hematoma fig. 7-b y el as pecto que toma en torno a los extremos fracturarios que conservan sus contornos angulosos y en unos puntos están rodeados directamente por el coágulo , en tanto que en otro se observa la interposición de una capa de células entre el hematoma propiamente dicho y la cortical, como se aprecia en la fig. 7-c a mayor aumento y que pudiera interpretarse como un capilar. - En esta imagen se aprecia la persistencia de células aparentemente viables

en el extremo de la cortical.

Podemos considerar que el coágulo conserva la misma extensión que en el día anterior. En la fig. 8-a aparece su porción central, interfragmentaria, donde la fibrina mantiene una orientación perpendicular a las corticales. Los hematies en diferentes grados de conservación aparecen en grupos fig. 8-b.

La disposición de las porciones periféricas del hematoma es diferente, como apreciamos en la figs. 8-a y c. En la fig. 8-c vemos como el extremo de uno de los fragmentos óseos se encuentra rodeado por una masa de fibrina perpendicular a él. Externamente se localiza un claro acúmulo de células redondeadas de gran núcleo fig. 8-d, y es posible ver así mismo leucocitos neutrófilos y otras células de la reacción inflamatoria aguda, que surgen de nuevo en la fig. 8-e en la que existe una mayor densidad celular, de aspecto cordonal que en algunos puntos muestra una luz y que es de trayecto sinuoso, por lo que lo interpretamos como un capilar que penetra en la zona del coágulo.

A nivel de la medular el coágulo toma un aspecto más compacto que el que se expande por las partes blandas fig. 9-a, y borra la estructura de la médula grasa típica del animal adulto. A mayor aumento fig. 9-b, podemos observar el mismo fenómeno. En la fig. 9-c aparecen las células del infiltrado en torno a los vasos, de los cuales vemos uno cortado en sentido transversal y el otro en sentido longitudinal.

A una cierta distancia del trazo de fractura comienzan a proliferar las células de la superficie endostal, que se rodean de una sustancia fundamental de carácter fibrilar como vemos en la fig. 10-a. Las células multinucleadas que aparecen en el campo creemos deben interpretarse como células de estirpe sanguínea, ya que, permanecen alejadas de la superficie ósea y de la zona de infiltrado hemático.

La reacción periostal se estratifica a lo largo de las corticales en varias capas de células fusiformes, de orientación preponderantemente paralela a la cortical y del mismo espesor a lo largo de toda ella, desde el trazo de fractura hasta bastante distancia más allá, como podemos ver en la --fig. 11 a diferentes aumentos. Así en la 11-a, vemos la reacción en la proximidad del trazo de fractura. Tanto en esta como en la 11-b, que muestra una región más alejada del foco, se aprecia una capa celular más externa de células en paralelo, fusiformes, más pequeñas, que marcan un cierto límite respecto a los tejidos vecinos. En la figura 11-c vemos a mayor aumento -- que en las partes de la diáfisis más alejadas éste conglomerado celular se hace cada vez más escaso, limitándose a dos capas celulares. Células fusiformes que no muestran un claro índice de actividad proliferativa u osteoformadora con las técnicas usadas por nosotros.

Las figs. 12-a y b, a mayor aumento, nos especifican algo más la estructura de esta capa. En "a" vemos varios estratos celulares, de los cuales, el más próximo a la cortical está formado por unas células de mayor tamaño, de aspecto globuloso, total o parcialmente rodeadas por una sustancia fundamental que las separa de las células vecinas y que está anclada en la cortical. Sobre éstas, hay otra capa irregular de células de menor tamaño, también ovoideas, que muestran varios grados de transición hacia los estratos más externos formados por células fusiformes más pequeñas entre las cuales es posible, en ocasiones, vislumbrar vasos como en la fig. 12-a. De --fuera hacia dentro las células se van separando entre sí por una sustancia fundamental, que en algunos puntos toma aspecto fibrilar. Las células fusiformes presentan prolongaciones citoplasmáticas que parecen hacer contacto con las vecinas.

En las zonas más distales al foco de fractura, las células en contacto directo con la cortical aún no han depositado ningún tipo de matriz sólida como se aprecia en la fig. 12-b.

A nivel de las corticales ya hemos señalado los bordes nítidos que --

tienen los extremos fracturarios y, como en éstos es posible detectar en -- ciertos puntos la presencia de osteocitos en el interior de sus lagunas, -- algunos de los cuales muestran señas de desintegración y fragmentación. En otros puntos, como en la fig. 13, aparecen las lagunas vacías. En esta -- imagen surge un capilar que penetra la cortical desde la medular, y que -- conserva sus células limitantes, pero no muestra elementos formes en su interior que aparece coagulado, lo que indicaría, junto a las lagunas osteo-citarias vacías, su desconexión funcional.

En el tercer día postfractura, como vemos en la fig. 14, se aprecia aún la persistencia de un gran coágulo, con la fibrina esta vez mejor dibujada, en disposición perpendicular a las corticales. Las redes de la misma aparecen claramente diferenciadas y los restos celulares entre ellas no son muy distinguibles como vemos en la fig. 14-b. Se insinúa así mismo en la cavidad medular. El hematoma sigue infiltrando las partes blandas vecinas según vemos en la figura 14-a. En sus límites, desplazando las partes blandas, encontramos el mismo fenómeno que ya habíamos descrito en las -- fracturas de 48 horas de evolución fig. 14-c, es decir, un acúmulo celular formado principalmente por células redondas y células de aspecto fusiforme con un núcleo grande y abundantes vasos.

El coágulo aparece en su porción central acelular, con los hematies dispuestos irregularmente por grupos y vías en desintegración fig. 14-b.

Es de señalar que en este momento en torno al coágulo, los elementos del exudado inflamatorio son prevalentemente células redondas y fibro-blastos, sí así podemos considerar las células fusiformes descritas.

Como se aprecia en las figs. 14-a y c, las partes blandas circundantes siguen infiltradas por el hematoma y a su altura se demuestra una proliferación celular reaccional del mismo tipo que acabamos de describir, y que en algunos puntos alcanza gran densidad.

Llama la atención que las porciones más periféricas del hematoma ,

parecen rodeadas de una cápsula como se insinúa en la fig. 14-a y más claramente en la 14-d, en que a mayor aumento se vislumbra un estrato de 4-6 células fusiformes que envuelven los restos hemáticos.

La fig. 14-e presenta la invasión de la cavidad medular por el coágulo.

Estudiaremos ahora la reacción periostal. Está más desarrollada que a las 48 horas como vemos en la fig. 15. En las inmediaciones de la fractura alcanza varias capas, la más interna de las cuales, en contacto directo con la antigua cortical, muestra el depósito de una matriz orgánica abundante, que engloba y separa las células entre sí -fig. 15-c.

En las regiones distales -figs. 16-a y b- a la fractura, observamos una disminución del espesor de las capas de proliferación celular. Sus células, como se ve en la fig. 16-b, son fusiformes alargadas, paralelas a la cortical y en algunas zonas se rodean de un material aparentemente amorfo, tomando el color verde propio de la fibra colágena con el TC.

La fig. 15-a nos muestra una zona en las inmediaciones del trazo de fractura, en la que las laguna osteocitarias aparecen vacías, y la cortical, sin periostio en un cierto trecho, está directamente envuelta por el hematoma. Distalmente a esta zona se estratifica la respuesta celular en dos zonas diferentes. La más próxima a la cortical, como vemos en las figs. 15-a y b, está formada por células ovoideas que se rodean de una sustancia fundamental que toma la coloración verde con el TC, y que las separa de las vecinas. En algunas zonas -fig. 15-c- adoptan una disposición columnar, de dirección oblicua-perpendicular a la cortical. Esta disposición, que alcanza hasta 5-6 estratos celulares, disminuye en las zonas más alejadas a la fractura y se limita a una o dos capas celulares.

Las células piriformes tienen un núcleo excéntrico con 2-3 nucleolos bien marcados, un citoplasma basófilo granular que a veces muestra una zona perinuclear clara, es decir, son osteoblastos. En sentido opuesto a la corti

cal, las células fusiformes se aponen sobre lo que podemos considerar os -  
teoide, por el cuál están a su vez total o parcialmente englobadas.

Por fuera de esta zona toman las células un aspecto fusiforme, mos-  
trando una gradación desde las capas más externas -fig. 15-b- donde apare-  
cen más apelotonadas y de menor tamaño hacía las internas, que presentan un  
crecimiento y separación paulatina de las células que terminan en la capa  
antes descrita en la fig. 15-c.

Las corticales muestran abundantes lagunas vacías -figs. 14-b y 15-a  
en una cierta extensión a partir del trazo de fractura. Distalmente presenen  
tan variaciones en relación a las corticales idemnes.

La cavidad medular, como ya señalamos en la fig. 14-e, aparece deses-  
tructurada en las proximidades del coágulo, que es limitado por un abundan-  
te infiltrado celular como podemos observar en la fig. 16-a y que se extienen  
de a la mayor parte de dicha cavidad.

A una cierta distancia de la línea de fractura es posible observar a  
mayor aumento ( x120 ) -fig. 16-b- una clara reacción de las células de la  
superficie endostal, que han apuesto una nueva capa de sustancia fundamenen -  
tal de aspecto fibrilar que toma el verde con el TC y, sobre la cuál, hay -  
una serie de células fusiformes que recuerdan a las descritas a nivel del -  
periostio - fig. 16-c-.

Al cuarto día se ha desarrollado mucho la reacción periostal de for-  
ma que la masa celular se localiza claramente en torno al foco de fractura,  
aunque se extienda a lo largo de toda la diáfisis y es clara la presencia -  
de trabéculas óseas periostales, como después describiremos.

Al analizar el hematoma podemos apreciar, sin haber hecho medidas -  
cuantitativas, que su tamaño ha disminuido en relación a los días anterioen -  
res, como se puede ver si comparamos las figs. 17-a con las imágenes de los  
hematomas previos como las figs. 14 y 15-a. El coágulo que cierra el conen -



ducto medular parece comprimido y limitándolo hacia la medular sana, el acú  
mulo celular es grande y se extiende a bastante distancia -fig. 17-b-.

La porción central del hematoma, en lo que se refiere a la red de fi  
brina, es acelular como se aprecia en la fig. 17-a y está rodeado en la zo  
na que limita con las partes blandas adyacentes, por un infiltrado celular  
formado por elementos redondos que se entremezclan con células alargadas fu  
siformes, de núcleo central, con prolongaciones citoplasmáticas que estable  
cen contacto entre sí, y que no ofrecen una disposición ordenada aparente -  
mente - fig. 17-c-.

Este acúmulo celular , que en las regiones más periféricas -fig.17-c  
toma una disposición laxa, al acercarnos hacia el hematoma y las corticales  
se puebla más - fig. 17-d - y presenta un gran número de vasos en su inte -  
rior cuyas paredes están formadas por células alargadas. En torno a los ca  
pilares hay un acúmulo ligeramente mayor de células.

La reacción en la vecindad del periostio muestra también una mayor -  
densidad celular, con células fusiformes como las descritas, vasos y elemen  
tos ovoideos de mayor tamaño y de núcleo excéntrico, entre las que es posi  
ble ver figuras de mitosis.

Como hemos indicado anteriormente, la reacción periostal ha alcanza  
do en estos momentos un gran desarrollo y es posible diferenciar en ella va  
rias zonas de características diferentes.

En las vecindades del trazo de fractura, como ya habíamos visto an -  
tes, la reacción alcanza su máximo desarrollo a una cierta distancia del fo  
co fracturario, es decir, las células quedan limitadas entre la cortical an  
tigua y el hematoma - fig. 17-a -, fundiéndose en esa zona con la reacción  
celular que lo invade. A gran aumento - fig. 18-a y b - observamos que las  
células de la parte más significativa toman un aspecto fusiforme-ovoideo --  
con un núcleo excéntrico, que presenta con frecuencia un nucleolo. El cito

plasma intensamente basófilo es granular. Unas zonas muestran una sustancia fundamental con aspecto fibrilar - fig. 18-a - de dirección oblicua a la cortical. En otras, las células se separan entre sí, la matriz se hace más patente y las rodea adquiriendo aspecto de cápsula. Tanto en un caso como en otro toma la sustancia fundamental el color verde con el TC, y en las zonas de mayor apariencia fibrilar es mayor la intensidad de la tinción, índice de la presencia de colágeno.

En el área de mayor desarrollo de la reacción subperiostal -fig.17-d y 19-a - encontramos una diferenciación en dos regiones. La capa más externa - fig.19-b - está formada por células fusiformes, colocadas en paralelo a la cortical, de núcleo grande, central, que se tiñe intensamente. Se aprecian algunas células en mitosis. Paulatinamente, al acercarse a la -- cortical, toman las células forma ovoidea, su eje mayor se coloca perpendicular a la capa anterior, y por tanto a la cortical, aumentan de tamaño y se separan entre sí por un incremento de la sustancia fundamental que engloba una parte de las células -fig.19-a-.

La capa más externa -fig.19-b-, como ya hemos dicho, está formada por varios estratos celulares de orientación paralela a la antigua cortical. Sus células fusiformes, de gran núcleo hipercromático y prolongaciones citoplasmáticas - fig.19-c -, están separadas por abundantes fibras que toman las tinciones del colágeno y entre ellas se observa, de trecho en trecho, la penetración de vasos como el de la fig. 19-c, del cuál parece desprenderse una célula como las que acabamos de describir.

Por dentro de esta capa encontramos un estrato que alcanza mayor altura y en el que podemos descubrir a intervalos regulares, unos acúmulos de células y sustancia fundamental de aspecto macizo y de orientación perpendicular a la cortical, que consideramos como trabéculas neoformadas. Figs. 19-a y 20-a. Las células de estas supuestas trabéculas son más grandes que el resto, de forma ovoidea, con su eje mayor orientado en el sentido de la trabécula, con un núcleo excéntrico y en ocasiones un nucleolo. Las de mayor tamaño, de hasta dos veces las de las capas más externas,

muestran vacuolas en su citoplasma. La fig. 20-b reproduce el aspecto -  
más periférico de una de estas formaciones, donde vemos cómo las células -  
van ganando en tamaño y se separan por la sustancia fundamental, que les -  
forma una cápsula en las cuales quedan incluidas a veces varias células. -  
En la fig. 20-c, que muestra otra zona trabecular, se disciernen prolonga-  
ciones citoplasmáticas que a través de la matriz comunican las células en  
tre sí.

Las áreas intertrabeculares están ocupadas por células de disposi-  
ción más anárquica, de menor tamaño - figs. 20-a y c -, con una matriz más  
laxa y de aspecto fibrilar, en la cuál se distinguen con frecuencia vasos.  
-Fig. 20-a -

En esta fase, y a pesar de no haber recurrido a las técnicas especia-  
les de estudio de la vascularización, es posible calibrar la extensión de -  
la misma. En la fig. 19-c vimos la penetración de un capilar en la capa -  
periostal externa. En las figs. 21-a y b, hemos podido captar el acerc-  
amiento de un vaso a la cortical. La pared está formada por células planas,  
de núcleo prominente, por fuera de las cuales hay una serie de células ovoi-  
deas que aumentan de tamaño y tienen un núcleo más prominente. A este ni-  
vel no se aprecia aposición ósea sobre la cortical, como muestra el osteo-  
blasto vecino. La fig. 21-b reproduce más claramente lo que interpretamos  
como el punto de penetración del vaso en la cortical.

La reacción periostal en las zonas alejadas del trazo de fractura, -  
fig. 22-a, se diferencia claramente en 2 estratos, uno externo de 4-5 célu-  
las fusiformes, como las ya descritas, que sin transición pasa al área inter-  
na de otras 3-4 capas de células de mayor tamaño, claramente separadas en-  
tre sí por sustancia fundamental y colocadas en paralelo a la cortical.

A nivel de la cavidad medular, como ya hemos señalado, existe un ta-  
pón de fibrina que lo cierra, como vimos en la fig. 17-b, por dentro del --  
cuál hay un gran acúmulo celular que distorsiona su estructura normal -fig.  
23-a - y junto al infiltrado hemático se ven en el centro de esta cavidad -

fig. 23-b, células redondas.

Sobre la superficie endostal -fig.23-c- de la cortical, se acentúa - el fenómeno observado en las fracturas de 3 días, es decir, hay una proliferación de los elementos de su superficie que forman 3-4 capas de células fusiformes, con núcleo grande que se tiñe intensamente, presentando en ocasiones nucleolo, y que se rodean de una matriz fibrilar que toma los colorantes del colágeno. Pero junto a esto, en algunos puntos de la superficie endostal de la cortical, surgen células multinucleadas que horadan la cortical y que antes no habíamos podido encontrar - fig. 23-d -. Las podemos -- considerar osteoclastos.

Las corticales presentan sus lagunas osteocitarias vacías en la vecindad del trazo de fractura, en tanto que en las zonas alejadas no muestra modificaciones dignas de mención en su morfología.

Al quinto día postfractura - fig. 24-a - observamos claramente dos fenómenos, por un lado la gran disminución del hematoma fracturario que aún está presente, pero englobado por la reacción celular de vecindad, y por -- otro lado vemos que esta reacción celular ha tomado contacto claramente con la que proviene del lado opuesto, formando un verdadero anillo externo en torno al foco de fractura. Este anillo se limita en las capas más externas por un estrato múltiple de células dispuestas en paralelo a la cortical.

La disposición celular en anillo se extiende a corta distancia, de forma que, en regiones donde aún persiste el infiltrado de la cavidad medular, el estrato periosteal se limita a una capa de 2-3 células -fig.24-b-.

El coágulo, como vemos en estas mismas figuras, aparece encapsulado en especial por fuera de las corticales e inmerso en la reacción periosteal, está formado por masas de fibrina sin una disposición particular salvo en su porción más externa donde se coloca en círculo y parece rodear el resto del coágulo. Las células que lo circundan -fig. 24-b y c- son en parte redondas con un gran núcleo que ocupa casi toda la célula y, en parte, células -

las fusiformes.

A nivel del conducto medular, el hematoma es más extenso porque ocupa además la línea de fractura - fig.25-a -. La fibrina forma modo de pegotes, sin estructura particular, que hasta cierto punto se orientan en paralelo al eje mayor del hueso, y entre los cuales no se distinguen restos de hematies. En la región comprendida entre la cortical y el hematoma, junto a la reacción osteogénica de las células de la superficie endostal, encontramos el mismo aspecto de barrera limitante, descrito antes, formado por células fusiformes y redondas -fig. 25-b-.

En la parte libre del canal medular se observa una gran celularidad integrada por unas células fusiformes -fig. 25-c-, de núcleo pequeño central, con prolongaciones citoplasmáticas y otras redondeadas, pequeñas, de núcleo grande e hipercromático. Por último hay otras células más grandes ovoideas, redondas, de núcleo grande y claro, con uno o dos nucleolos. Entre estas células parece depositarse una sustancia fundamental fibrilar, que sigue el eje del canal medular y que se tiñe positivamente con el VG para el colágeno.

La reacción periostal, que ha tomado ya el aspecto de vitola circunferencial externa - fig.24-a y 26-a presenta claramente, más aún que en el día anterior, varias zonas desde la vecindad a la antigua cortical hasta las partes blandas periféricas.

En la región limitante con el coágulo, y entre éste y la cortical, es similar la disposición a la descrita a nivel del canal medular fig.25-b

La máxima anchura es alcanzada un poco más distalmente, como vemos en la fig. 26-a. En contacto con la cortical y a todo lo largo de ésta, - hay 3-4 capas de células fusiformes, dispuestas de forma regular, con su eje mayor paralelo a la cortical, con un núcleo central. Es posible apreciar, a veces, la existencia de prolongaciones citoplasmáticas que se introducen en la sustancia fundamental que las rodea creándoles una laguna - -

fig. 26-b. Estas células, que podemos considerar como osteocitos, tienen mayor tamaño que los de la antigua cortical y son más abundantes. En al gún punto alcanza esta disposición una estratificación más amplia fig.26-a, con células de las mismas características. La sustancia fundamental toma la tinción verde con el TC y llama la atención que esta zona aparece en todos los cortes sin capilares demostrables.

En otras áreas -fig. 26-a-, la zona media, entre la capa inmediatamente apuestas sobre la cortical y la más externa, está formada por grandes células redondas separadas por una sustancia fundamental abundante, de aspecto claro con la H.E. y que toma un poco el VG y el TC con el que se tiñe de verde claro, mostrando la presencia de fibras colágenas, pero en mucha menor proporción que en la banda previamente descrita. No hemos he cho tinciones que pongan de manifiesto la metacromasia de esta matriz, -- que, suponemos por las características de las células, se trata de áreas cartilaginosas.

En unos puntos - fig. 27-a - esta disposición llega hasta la misma cortical, mientras que en otras limita con la capa osificada. Sus célu - las en la parte más externa son fusiformes, como ya hemos descrito, y se van disponiendo a partir de ahí en columnas de dirección perpendicular a la cortical - fig.27-b - hacia la cuál van aumentando de tamaño, se hacen redondeadas, el núcleo crece y presenta un nucleolo.

En las zonas más próximas a la cortical y en el espesor de estas - masas, las células se hipertrofian, muestran vacuolas en su citoplasma -- que desplazan al núcleo - fig.27-a -. Cada célula ocupa una laguna, aunque en ocasiones es posible ver 2 células por laguna. En la fig. 26-a, y a mayor aumento en la 27-c, observamos que atravesando esta zona y en di rección oblicua desde las partes blandas hacia la cortical, surge un trac to de células fusiformes, alargadas, que se imbrican las unas con las -- otras y que podemos interpretar como un capilar que penetra esta región.

Las capas más externas de la reacción periostal -figs.26-a y 27-d-

están formadas por 4-5 estratos de células fusiformes de núcleos hipercromáticos, entre las cuales existen abundantes vasos. Las células fusiformes - dan paulatinamente lugar a las ovoideas más voluminosas previamente descritas - fig.27-b -. Entre estas capas de células fusiformes aparecen aisladamente focos de osteogénesis, que suponemos surgen en torno a los vasos, como el de la fig. 27-e.

Las zonas de la reacción periosteal alejadas de la fractura, disminuyen paulatinamente de altura al igual que en días anteriores, y la capa externa de células fusiformes paralelas está en relación directa con la zona de osteogénesis supracortical -fig. 22 -. En el área declive de la reacción periosteal encontramos una penetración de vasos desde el exterior. En la figura 28-a es posible apreciar la disposición de una trabécula. Entre dos áreas vasculares hay una zona con menos células, que están dispuestas - en paralelo y rodeadas de sustancia fundamental. En el centro de este área parece existir un vaso.

A nivel del canal medular y más allá de la reacción en torno a los - restos del coágulo, podemos descubrir una osteogénesis abundante -fig.29-a- en la cuál no parece existir cartílago. Las trabéculas se orientan en paralelo a la antigua cortical, que queda así envuelta entre la aposición endostal y periosteal - fig.29-b -. Las células trabeculares son alargadas, con un núcleo excéntrico e hipercromático. Las trabéculas son bastante regulares y entre ellas es posible apreciar un abundante número de vasos. Sobre la superficie endosteal de la cortical, observamos así mismo una reacción osteogénica del mismo tipo al descrito a nivel periosteal. En toda la medular las células encargadas de la formación trabecular son de aspecto similar a las que aparecen en íntima relación con el endotelio vascular.

Las corticales muestran lagunas osteocitarias vacías en sus extremos como vimos en las primeras figuras, y es de señalar que a nivel de la reacción periosteal máxima, aparece una mayor vascularización de la cortical a - partir de vasos neoformados repletos de sangre - fig.30-.

Pasamos a considerar ahora el sexto día tras la fractura. Aún es perfectamente perceptible la existencia del coágulo -fig.31-a-, que como en el quinto día, está formado por acúmulos de fibrina de disposición irregular en torno a los extremos de los fragmentos y ocluyendo el canal medular junto al trazo de fractura. Cuando el corte no es central o los fragmentos están angulados, sus extremos están perfectamente englobados en la reacción del callo - fig.31-b -, en la cuál vemos que, incluso en las proximidades de la cavidad medular, la reacción que envuelve al fragmento presenta trabeculación ósea. Por el contrario, hacia el exterior y en continuidad con la anterior - fig.31-c -, la reacción está formada principalmente por un tejido muy vascularizado de células fusiformes, prolongación del tejido que aparece en la periferia del hematoma como en la fig. 24-a. Podemos interpretar esta disposición como el callo intermediario de los autores clásicos.

En torno al coágulo, junto a la reacción de las partes blandas, hay en inmediato contacto con los detritus hemáticos una gran cantidad de vasos perfectamente diferenciados - fig.32-a - y una gran cantidad de células redondas - fig.32-b - que perifericamente, en relación con las partes blandas y con el callo intermediario, son sustituidas por células fusiformes de núcleo claro, grande, y nucleolo. En contacto con los capilares es posible ver, en ocasiones, acúmulos de células fusiformes que parecen salir de su interior - fig. 32-c -. La sustancia fundamental entre estas células toma aspecto fibrilar colágeno, dispuesto de forma irregular y con poca densidad entre las células.

En la cavidad medular los restos del hematoma están rodeados por células como las descritas a nivel periostal así como por células gigantes - fig. 33-a. En otros puntos - fig.48-c - surge una reacción osteogénica que toma contacto con los extremos corticales como hemos descrito, y que a mayor aumento aparece formada por trabéculas óseas en el eje de la medular, con una celularidad ordenada, y estructuras vasculares entre dichas trabéculas - fig.33-b -. Las células de la superficie trabecular en unos puntos son piriformes con el núcleo en el polo opuesto al hueso; un nucleolo; y el citoplasma rugoso. En otros puntos las células son más aplanadas y de



núcleo hipercromático. Tanto unas como otras, como las incluidas en la trabécula, muestran prolongaciones citoplasmáticas que las ponen en contacto entre sí.

Nos ocupa ahora la reacción periostal, que se estructura claramente en varias zonas. En unos puntos la reacción se limita a unos 5-6 estratos de células fusiformes, de núcleo claro, separadas por una matriz que toma las tinciones del colágeno y que se localiza entre la antigua cortical y la reacción que bordea al hematoma de la cuál se separa por una capa fibrosa, pobre en células como en la fig. 26-b.

En otras áreas cerca del foco fracturario - fig. 34-a -, aparece un tejido formado por grandes células redondeadas, de núcleo claro, grande, con nucleolo y un citoplasma, que a grandes aumentos aparece granulado - figs. 27-a y b. Estas células -fig. 34-b - están incluidas en una sustancia fundamental abundante, que toman la tinción verde con el TC con menor intensidad que otras zonas y que muestran una estructura muy homogénea. En algunos lugares estas células alcanzan aún mayor tamaño, la matriz entre ellas se adelgaza, adopta aspecto de cápsula. El citoplasma celular se retrae en parte y se llena con vacuolas. El núcleo de estas células se hace menos diferenciable. Fig. 34-c.

Esas áreas, que a pequeños aumentos son bastante homogéneas, muestran a mayores aumentos la penetración de vasos, como podemos considerar los cordones de células alargadas, fusiformes, que se insinúan entre las previamente descritas - figs. 34-b y c -. En la fig. 34-c parece que estos cordones celulares invaden las lagunas cartilaginosas.

Por fuera de esta capa cartilaginosa, central, hay una capa integrada por un mayor número de células dispuestas en paralelo y de aspecto fusiforme, entre las que es posible apreciar también la existencia de vasos. Estas células fusiformes originan paulativamente y a través de una disposición más o menos columnar, la estructura cartilaginosa descrita anteriormente similar a la encontrada en el quinto día y que vemos en la fig. 27-a-

La reacción subperiostal muestra al alejarse del trazo de fractura y de manera decreciente - fig.35-a -, una región de aspecto irregular directamente subrepuesta a la cortical, constituida por una trabeculación - ósea y perifericamente a la misma, una capa celular continua.

La zona en contacto directo con la cortical, tiene la misma estructura que en los días anteriores, es decir, un estrato entre 3 y 5 células de aspecto globuloso envueltas en una matriz de carácter fibrilar. La capa intermedia - fig. 35-a - está integrada por una serie de trabéculas - de orientación paralela a la cortical y de celularidad escasa. En las zonas osificadas - fig.35-b - las células apuestas sobre su superficie, - son aplanadas y entre ellas aparecen una serie de células sueltas y espacios vasculares. En puntos más alejados de la fractura, las trabéculas - son más gruesas y más celulares. Las células del interior son ovales-fusiformes y se asemejan a las que aparecen sobre la superficie de las trabéculas que son grandes, con el núcleo desplazado hacia un polo celular y el citoplasma granuloso. Entre las trabéculas, de menor calibre que en las zonas antes descritas, aparecen espacios vasculares.

En algunos puntos es posible - fig.34-c - ver como los tractos -- vasculares separan una zona de cartilago de otra, dándoles el aspecto de trabécula que acabamos de describir. La porción más periférica de toda - esta región, está formada por un estrato pluricelular, cuyos elementos -- aplanados se aponen ganando tamaño sobre las trabéculas descritas -fig.35 -c.

La reacción subperiostal se extiende con intensidad decreciente a lo largo de toda la cortical estudiada.

A nivel de la cavidad medular, observamos a lo largo de toda la superficie endostal una reacción osteogénica como la descrita en los días - anteriores. En los puntos donde el hematoma ha sido desplazado, aparece una osificación directa sin la presencia de cartílago, que se continua --

con el callo intermediario. No hemos encontrado una comunicación entre el callo endomedular de ambos fragmentos como sucede en este momento con la - reacción periostal, pero sí de ésta a través del callo intermediario con - la osteogénesis endomedular. Podemos considerar entonces que a esta altura la fase de urgencia del callo se ha cumplido. \

Las corticales muestran las lagunas osteocitarias de sus extremos - vacías en una extensión variable, y es posible, a dichos niveles, observar la penetración frecuente de capilares desde la medular - fig.36-a -, e incluso desde el trazo de fractura - fig.36-b - en la que vemos que el capilar entra en una zona de la cortical totalmente acelular. En torno a los extremos y fragmentos sueltos esta reacción puede ser mucho más intensa como en la fig. 36-c. El resto de la cortical no muestra alteraciones significativas ni cambios en relación al día anterior.

En el séptimo día postfractura, el último de los días consecutivos estudiados, alcanza el callo un gran desarrollo, como vimos en las imágenes macroscópicas y vemos en la fig. 37-a y b, en las que es posible apreciar el gran volumen alcanzado por la reacción periostal que desplaza claramente las partes blandas circundantes. En la figura 37-a, se observa que aún persistiendo el coágulo, ambos manguitos periostales han entrado en contacto por fuera de aquél y han solidarizado ambos fragmentos. A estos aumentos llama la atención el gran volumen alcanzado por las masas cartilaginosas en las proximidades del trazo de fractura.

El coágulo persiste en algunos puntos - fig.37-a -, mientras que en otro ha disminuido mucho de tamaño - fig.37-c -. Su parte central está -- formada por las mismas masas de fibrina que en días anteriores, pero su invasión celular es más marcada - fig.37-c -. Las células, unas redondas y otras fusiformes, en las inmediaciones de los restos hemáticos forman acúmulos muy densos - fig.37-d y c -. Entre las células fusiformes se aprecia una matriz tisular fibrosa, positiva a las tinciones para el colágeno.

A nivel del conducto medular, en los puntos donde es aún perceptible el hematoma fracturario, - fig.38-a -, vemos una gran celularidad en la que es posible discernir la presencia de células gigantes multinucleadas. Los bordes de la reacción celular, en contacto inmediato con el hematoma -fig. 38-b -, tienen una matriz fibrilar con abundantes células fusiformes, como a nivel periostal, entre las que se descubren abundantes espacios vasculares, algunos de ellos de gran tamaño - fig.38-b -. Vemos pues, que la - reacción celular en torno al hematoma es parecida a la de los dos días anteriores. La reacción periostal como hemos comentado alcanza gran desarrollo, lo que es posible apreciar en las figs. 37-a y b, y en ellas podemos - diferenciar por un lado la presencia de unas áreas cartilaginosas en la vecindad del trazo de fractura, que se extienden desde la cortical hasta el límite con las partes blandas vecinas. A medida que nos alejamos del foco, estas masas cartilaginosas son sustituidas por una zona de trabeculación ósea, que en las inmediaciones al cartílago tienen una orientación oblicua e incluso perpendicular a la cortical para, paulatinamente, dar lugar a -- trabéculas de dirección paralela a la cortical - figs. 39-b y c - en sentido próximo-distal al trazo de fractura.

En las áreas cartilaginosas - fig.39-a y b - hay una evolución de su población celular desde las capas periféricas, que están formadas por - varios estratos de células fusiformes, de núcleo central hipercromático, con prolongaciones citoplasmáticas que se insinúan entre las fibras de la matriz orgánica, y que dan lugar en varios pases, a la zona cartilaginosa. - Las células del área transicional aparecen aumentadas de tamaño, de forma oval redondeada, el núcleo se hace excéntrico y continua hipercromático, - algunas de estas células continúan mostrando prolongaciones citoplasmáticas, en tanto que otras se hacen totalmente redondas, el núcleo se hace -- más claro, muestra un nucleolo y el citoplasma se hace granular como vimos en las figs. 20-b, 27-b y 35-c.

Son áreas celulares muy densas que comienzan a mostrar en las zonas laterales la penetración de vasos, y hacia la cortical dan lugar a áreas - de cartílago calcificado que contactan con la trabeculación ósea neoforma--

da suprayacente - fig.39-b -.

A mayor aumento vislumbramos en algunas zonas que las lagunas tienen sus paredes engrosadas y se tiñen muy intensamente. Las células en su interior son grandes, con vacuolas en su citoplasma que puede aparecer retraído y, en algunas, el núcleo es difícilmente identificable. Consideramos - estas áreas como de cartílago calcificado - fig.39-d -. En la fig. 39-e - vemos una de las zonas de transición en que se inicia la penetración vascular.

En algunos puntos -fig.40-a -, en vecindad inmediata al trazo de -- fractura y en otros algo más alejados, podemos observar a lo largo de toda la cortical en contacto inmediato con ella - fig.37-b - una aposición ósea, similar a la descrita en los días anteriores. Por encima de ella y hacia - la capa periosteal externa, existe una trabeculación de orientación cambiante que, en las proximidades del trazo de fractura, se entremezcla con las masas cartilaginosas y es de orientación perpendicular a la cortical -fig. 37-b - para hacerse después, poco a poco, paralela a la cortical - fig.39-c y disminuir claramente la densidad de las trabéculas, que aparecen rodeadas de abundantes lagunas vasculares y células, adoptando en esas zonas aspecto esponjoso.

En las proximidades del cartílago, entremezclado con él, y en las zonas de trabeculación vertical estas presentan, como hemos comentado, una mayor densidad con celularidad abundante que en unas zonas está formado principalmente por células ovoideas de núcleo claro excéntrico, en tanto que en otras regiones conservan aspecto cartilaginoso.

Tiene a nuestro parecer gran importancia la permeación por capilares de esta zona, que toma diferentes aspectos; así en unos puntos podemos observar aumento de tamaño de las lagunas celulares, que presumimos sucedió - por confluencia de varias - fig.40-b - y que aparecen repletas de grupos - celulares en torno a una luz central, las células son fusiformes, con un núcleo hiper cromático. En otros puntos vemos como una trabécula maciza es --

perforada por un grupo de células, también en torno a un capilar, y que -- crean así un espacio - fig.40-c -, quizás ambas imágenes sean proyeccio - nes ortogonales del mismo fenómeno. A estas alturas se demuestran en oca- siones células multinucleadas a la cabeza del frente perforado - fig.40-d.

Por fin, en las zonas más alejadas del foco fracturario, alcanzan - los espacios vasculares un gran desarrollo, que a mayor aumento aparecen - formados por la pared vascular y 1 ó 2 capas celulares entre ella y la - pared de la trabécula - fig.40-a y b -. Trabéculas y espacios vasculares se colocan en paralelo a la cortical. Las células incluidas en las trabé- culas conservan en parte la disposición primitiva y en parte van siendo -- más pequeñas, fusiformes, redondeadas y regularmente distribuidas.

La capa periostal externa en las vecindades del trazo está formada, como señalábamos, por un estrato pluricelular que va disminuyendo en altu- ra hacia la epífisis, de forma que en sus proximidades las trabéculas que- dan cubiertas y separadas de las partes blandas sólo por 1-2 capas celu- res - fig.41-b -. En la fig. 43-b vemos como en zonas alejadas al trazo - hay una formación trabecular por fuera de las áreas cartilaginosas.

La reacción endomedular se ha desarrollado mucho y aparece más com- pleja al existir diferentes áreas en la misma que debemos estudiar. En la fig. 38 pudimos ver la reacción celular en torno a los restos hemáticos . En algún punto se descubre cartílago - fig.42-a -, pero en general la cavi- dad medular muestra una celularidad muy intensa con regiones de osteogéne- sis directa - fig.38-a -. Como en días anteriores, sobre las corticales - aparece en infinidad de puntos áreas de osteogénesis directa. Las células fig. 42-c se rodean de una sustancia fundamental fibrilar, positiva a las tinciones del colágeno. Son células redondas, ovoideas, de núcleo más o - menos cromático y nucleolos visibles en muchas ocasiones. Alejándose del trazo, esta reacción celular densa, igual a la que cubre las superficies - endostales de las corticales, va siendo sustituida por trabéculas de orien- tación paralela a la cavidad medular que recupera paulatinamente su morfo-

logía normal. En algún punto la osteogénesis intramedular forma a modo de globos - fig.42-c -. En general el aspecto es similar al de días anteriores, como vimos en las figs. 29-a y c.

En estas fases pierden las corticales su carácter regular y uniforme, en especial en su vertiente medular, que si en unos puntos está cubierta por la osteogénesis endostal, en otros es perforada por vasos que invaden la cortical - fig.43-a -, hasta el punto de separar los extremos corticales muertos como vemos allí. En la fig. 38-a aparece la cortical con una indentación irregular, a nivel medular y periostal - fig.43-b -, que a mayor aumento está formada por osteoclastos - fig.43-c y d - que preceden, en ocasiones, a los vasos en su penetración. Los vasos invaden unas veces áreas de lagunas osteocitarias vacías - fig.44-a -, en tanto que en otras, la cortical perforada muestra sus osteocitos en buen estado figs.44-b y c, en esta última imagen observamos que el vaso se acompaña de una gran atmósfera celular y esponja la cortical. En estos puntos no hemos descubierto la presencia de células gigantes multinucleadas.

En el décimo día, han desaparecido prácticamente los restos del coágulo tanto en las costillas como en la tibia, y la reacción celular ha alcanzado gran volumen, pensamos que el máximo para las costillas en las preparaciones por nosotros examinadas - fig.45-a -.

Los extremos corticales aparecen irregulares, y como vemos en la - fig . 45-a , en su entorno se ponen en contacto las reacciones celulares , medular y periostal, de forma que el callo intermediario aparece perfectamente desarrollado. Se integra principalmente por células que se asemejan más a las de estirpe medular, pero sin que podamos afirmar en nuestro estudio cual sea su origen, ya que, entran en relación con el tejido que ocupa totalmente el antiguo trazo fracturario. Las células fusiformes - fig. -- 45-b -, forman un acúmulo abigarrado. Entre ellas surge una gran cantidad de vasos, en general de estructura capilar. Las células son grandes, de citoplasma oscuro y presentan en general un núcleo excéntrico. Entre -

ellas aparecen abundantes fibras, como hemos descrito para los días anteriores - figs.29-c y 18-a -.

En la embocadura del canal medular, y a modo de tapón - fig.45-a -, las células se separan entre sí y toman una disposición global perpendicular a las corticales. La sustancia fundamental entre ellas, de aspecto fibrilar óseo, se hace más abundante e incluye copiosos vasos. Su imagen es similar a la de la fig. 42-b. El callo endomedular, por dentro de la zona que acabamos de describir - fig.46-a -, presenta una osteogénesis reaccional que lo ocupa totalmente, y está formada por trabéculas de orientación paralela a la cortical entre las cuales aparecen vasos de aspecto capilar, cuya luz estrecha está bordeada por una sola capa de células. En otros -- puntos más alejados del trazo, toman los vasos un calibre mucho mayor y - aparecen repletos de hematies. Podemos considerar estos vasos como lagos venosos. Las células incluidas en las trabéculas son pequeñas, de disposición bastante regular y oviodeas. Las células de la superficie trabecular tienen en muchos puntos un aspecto aplanado y son como las de la fig.46-b.

El callo periostal, como ya hemos señalado, alcanza un gran desarrollo como vemos en la fig. 47-a. Se estructura, como en días anteriores en una capa interna y en contacto directo con la antigua cortical a la que cubre, formada por una trabeculación ósea de orientación cambiante. La segunda capa, externa a la anterior, es cartilaginosa y, por fuera de ella, la tercera, limitante con las partes blandas. Esta zona periostal externa en unos puntos muestra trabeculación ósea, aunque la mayor parte está formada por un estrato múltiple de células fusiformes de orientación paralela a la cortical, y perpendicular a las células cartilaginosas.

Entre las capas cartilaginosas superpuestas a los fragmentos y en la zona del antiguo trazo fracturario - fig.47-b -, aparece un cordón celular orientado hacia las corticales. Sus células son fusiformes de menor tamaño que las células cartilaginosas, tienen un núcleo central hipercromático, y están separadas entre sí por fibras que toman las tinciones específicas.



ficas del colágeno. Estas células se continúan con las del callo intermedio - fig.45-b -. Podemos considerar, por tanto, que el trazo de fractura, una vez desaparecidos los restos del hematoma, se ha rellenado por un tejido fibroso que se relaciona con las capas periostales externas así como con los callos medular y periostal a cuya población celular contribuye.

La capa más interna de trabeculación ósea, aparece, como ya conocemos, en las vecindades del trazo de fractura de orientación perpendicular a la cortical, de aspecto macizo y entre las trabéculas aparecen vasos -- que unas veces llegan y otras no hasta dicha cortical, son, así mismo, de orientación perpendicular a ella - fig.47-a -. En una zona más alejada, - aparecen las trabéculas mucho más porosas por la abundancia de vasos que - las atraviesan - fig.47-c -. Cuando la reacción periostal decrece cam-bia la orientación de las trabéculas, que se hacen menos abundantes y paralelas a la cortical - fig.47-d - y entre ambas aparece un trayecto vascu-lar de la misma dirección.

La región más próxima a la epífisis, muestra una pérdida de los límites netos entre cortical y reacción periostal, por la orientación paralela de las mismas, y la penetración vascular similar, en ambas zonas - fig. 47-d -. La trabeculación ósea está directamente superpuesta a la cortical sin interposición de cartilago; los lagos vasculares tienen una orienta--ción cambiante como vemos en esa figura, pero llama la atención la existen-cia de un amplio trayecto vascular interpuesto entre la cortical y la zona de aposición ósea.

La capa intermedia, cartilaginosa, es la que alcanza un mayor desarrollo, como apreciamos en la fig. 48-a. En sus zonas periféricas, como - aparece en las figs. 47-b y 48-b, la primera de las cuales muestra los límites de la zona cartilaginosa y el tejido fibroso que ocupa el antiguo trazo de fractura, en ella podemos observar el paso paulatino desde las células fusiformes centrales hacia las cartilaginosas, que van a formar los dos manguitos periósticos, y cuyas células toman una orientación perpendicular a las primeras.

Las figs. 47-d y 48-b muestran la capa periostal externa, en este momento ya sólo formada por 2-3 células que, en algunos puntos, se insinúan hacia el bloque cartilaginoso como si indicarán la penetración de vasos en aquél, vasos que, por otro lado, comienzan a mostrarse en el interior del área cartilaginosa como apreciamos en dicha imagen así como en la fig. 48-a.

Las células de las áreas cartilaginosas perfectamente desarrolladas, además de presentar por trechos una disposición columnar - fig.47-a -, muestran una graduación en sus tamaños. Hay células pequeñas redondeadas, inmersas en una laguna que está separada de las vecinas por abundante sustancia fundamental, otras han crecido al igual que la laguna, de cuyas paredes se separa con frecuencia la membrana celular, disminuye a la vez la cantidad de matriz cartilaginosa. En algunas regiones se hipertrofian las lagunas, las células muestran vacuolas citoplasmáticas, y en parte aparecen desintegradas, como ya conocemos de días anteriores.

En algún punto de esta región cartilaginosa - fig.48-c -, las lagunas de tamaño grande, pero sin alteraciones muy manifiestas de las células, presenta una pared muy intensamente teñida con todos los colorantes, adoptando el mismo color que las antiguas corticales, por lo que las interpretamos como áreas de cartilago calcificado - fig.39-d-.

Tiene interés analizar la penetración vascular. A pequeños aumentos vemos que los vasos aparecen como cordones celulares, en los cuales se demuestra en ocasiones una luz, se dirigen desde las zonas limítrofes hacia los grupos de células hipertróficas. Cuando la penetración vascular alcanza mayor desarrollo, el canal por ella labrado es más grande y en torno al capilar aparecen varias capas celulares, que en las zonas más externas se separan entre sí y, tomando una morfología oval, se rodean de sustancia fundamental - fig.48-b-, que podemos interpretar como sistemas osteónicos en vías de formación.

A mayor aumento - fig.48-d - vemos que las cabezas de penetración --

vascular están formadas por células mononucleadas grandes, que van seguidas de un cordón integrado por células fusiformes que internamente limitan una luz, y externamente contactan con la matriz del tejido que penetran - fig. 41-a -.

Por último analizaremos los procesos que tienen lugar a nivel de las antiguas corticales. En la vecindad del trazo de fractura, y como ya vimos en los días anteriores, la cortical es perforada masivamente desde la medular por un frente celular - fig.49-a -, que se dirige a las zonas cuyos osteocitos han muerto por falta de aporte nutricional.

Las figuras 49-b y c, presentan una perforación de la cortical por abundantes vasos, en áreas bastante alejadas del trazo de fractura y en cuya vecindad se disciernen osteocitos viables. La penetración de la cortical desde el canal medular - fig.49-d -, se produce por un frente de grandes células, mayores que las que hemos visto en las áreas cartilaginosas, y que en algunos puntos son multinucleadas.

La siguiente fase en la evolución del callo, que hemos analizado, son las piezas obtenidas a los 14 días de producida la fractura. A nivel de las costillas el callo comienza a regresar - fig.50-a -, se delimita perfectamente y muestra una estructura más regular, que existe lo mismo en las tibias, donde alcanza mayor tamaño que en los días anteriores.

El hematoma, como ya dijimos para el décimo día, ha desaparecido totalmente - fig.50-b - y en su lugar hay una reacción celular, que aún con una disposición laxa, pone en contacto ambos canales medulares; a su nivel encontramos una diferenciación osteogénica con la presencia de abundantes lagos vasculares - fig.50-b -. En la fig. 50-c aparece esta osteogénesis más acentuada, al ser una zona más alejada del trazo de fractura. Las trabéculas muestran una disposición paralela a las corticales en las que anclan. Entre ellas, y más a medida que nos acercamos a las epífisis, aparecen las lagunas vasculares que van ganando en luz.

En la embocadura de la medular hay una zona celular muy densa, formada por células ovales de núcleo excéntrico, con prolongaciones citoplasmáticas y rodeadas de una matriz que se tiñe intensamente con el TC de verde, y presenta una transición gradual hacia un área de células ligeramente mayores, fusiformes, de orientación más irregular y rodeadas de una trama fibrosa como en la fig. 42-b. La fig. 50-d presenta una zona más distal de la reacción medular a nivel de un área de reabsorción de la antigua cortical, con células multinucleadas a ambos lados, que han hecho tomar a dicha cortical el grosor de una simple trabécula.

La vitola periosteal aparece organizada por áreas - fig.51-a -. A nivel del antiguo trazo de fractura, alcanza su máximo desarrollo y está ocupada por un tejido cartilaginoso que toma aspecto de V con el vértice a nivel de la solución de continuidad de las corticales. Desde ella hacia la epífisis va decreciendo la reacción periosteal, que está integrada entonces, por una trabécula ósea - fig.51-b - y de cartílago calcificado de orientación cambiante, que en las zonas metafisarias se hace paralela a la cortical y cuyos espacios vasculares se medularizan - fig.51-c -.

El área cartilaginosa - fig.52-a -, en su porción subperiosteal está limitada por un estrato de 2-3 células a partir de las cuales, y en 3-4 filas de células pequeñas, da lugar a una zona de células hipertróficas, separadas por muy escasa matriz, y con una disposición columnar. Lateralmente y hacia la medular con cuya reacción celular contacta - fig.52-b -, presenta un límite neto de transición hacia la trabeculación ósea formado por un gran acúmulo celular. A mayor aumento - fig.52-c -, apreciamos que dicha zona está formada por abundantes capilares que tienden a invadir la zona -- del cartílago hipertrófico. La zona inmediatamente vecina a ésta, presenta una serie de células rodeadas de una cápsula que se tiñe más intensamente - que la matriz que las rodea externamente. Estas lagunas - fig.52-c -, están parcialmente destruidas al quedar incorporadas a espacios vasculares cuyas células se aponen sobre la antigua matriz.

En otros puntos, distalmente a la zona cartilaginosa - fig.51-b -, -

encontramos una trabeculación ósea - fig.53-b - cuya estructura la forman por un lado células ovoideas rodeadas de una pared poco visible, y de otro áreas de matriz más clara, en cuyo interior resaltan las cápsulas de unas células mayores con amplios lagos vasculares entre ellas y una capa celular continua apostada directamente sobre las trabéculas. En otros puntos - fig.53-c, las células de las trabéculas son menores, con su eje paralelo a la trabécula y con una laguna mucho menos ostensible que en las anteriores. Las células apostadas sobre la superficie trabecular son más aplanadas. En diferentes puntos de este tipo de trabéculas podemos observar la penetración de nuevos vasos.

Las corticales, como ya vimos en la fig. 50-d, es atacada tanto desde su vertiente medular como la periostal - figs.54-a y b -. En la fig. 54-c vemos una gran permeación vascular de las corticales, mayor aún que en el décimo día postfractura. Los espacios así creados son mayores con una gran luz vascular. A nivel de la cara cortical externa - fig.54-b -, vemos también un frente de osteoclastos avanzando hacia la cavidad medular seguidos por una zona celular densa. La fig. 50-d nos muestra a mayor aumento los osteoclastos responsables de esta reabsorción cortical.

A las tres semanas de la fractura, fase siguiente en nuestro análisis encontramos, como en los otros días, que el callo a nivel de la costilla queda perfectamente delimitado, ha disminuido de tamaño, y la proporción de tejido periostal en la vitola externa es menor - fig.55-a - y, por el contrario, a nivel de las tibias el callo es mayor; pero toma la disposición ordenada que habíamos descrito para los quince días en la costilla, - fig. 55-b -, en el sentido de presentar un triángulo de base externa, de tejido cartilaginoso, a nivel del antiguo trazo de fractura, limitado por la trabeculación ósea que va sustituyendo a dichas zonas cartilaginosas.

En las costillas - fig.55-c - es posible ver como el callo medular cruza perfectamente el antiguo trazo de fractura, uniendo ambas medulares,

y anclándose en las corticales. En esta fase, los espacios vasculares han aumentado de tamaño, la trabeculación es groseramente paralela a las corticales, aunque a nivel de las mismas, el callo intermediario - fig.55-d, es perpendicular a las mismas y de celularidad más densa. Las tibias muestran un puente medular entre ambos fragmentos, pero este es más celular y muestra una trabeculación ósea menos desarrollada. Celularidad que se mantiene así a nivel de las medulares tibiales. Por el contrario las costillas figs.55-a y c- muestran en una corta extensión, una trabeculación paralela a la cortical atravesada por grandes lagunas vasculares. La estructura de las trabéculas es similar a la descrita en días anteriores en el canal medular, así como a las trabéculas que aparecen en la reacción periostal más alejada del foco de fractura.

La reacción periostal en las costillas conserva una pequeña zona de cartílago, como hemos dicho, de disposición similar a la del 14 día, pero de menor tamaño - fig.56-a -. En otros puntos la masa es algo mayor, y alcanza más desarrollo en las tibias - fig.55-b -. Las regiones de cartílago calcificado - figs. 56-b y c - como hemos interpretado las áreas donde las lagunas presentan una pared muy intensamente teñida, con confluencia de algunas de ellas, y cuyas células de gran tamaño, en unos puntos aparecen de citoplasma vacuolado y picnótico, en tanto que en otros sólo vislumbramos detritus celulares en el interior de las lagunas.

En las figs. 56-c y d, vemos como se realiza en este momento la - - transición hacia las zonas de trabeculación ósea. Al contrario que a los 14 días, la transición no es brusca. Entre el área cartilaginosa pura y - el área trabecular existe una banda - fig.56-d -, en la cuál vemos que sobre restos de la antigua matriz cartilaginosa calcificada que ha perdido - su estructura lacunar, y sus células en muchos puntos, se ha depositado -- una nueva matriz. En esta zona perforada por vasos, las trabéculas así - formadas toman una disposición anárquica, su superficie está en parte cu-bierta por células y entre ellas se aprecia la existencia de vasos - fig. 56-d -.

La vitola periostal en la zona de mayor desarrollo, a pesar de haber desaparecido el cartílago muestra también varias capas:

1.- una interna en contacto con la cortical y de orientación paralela a la misma - fig.55-a -, formado por un estrato de 2-3 células

2.- una capa intermedia - figs. 55-a y 57-a - más anárquica y de orientación cambiante. En las proximidades de la línea de fractura la trabeculación es más densa y de orientación perpendicular a la cortical. Ha-cia la epífisis disminuye el número de trabéculas y estas se hacen más paralelas a la cortical

3.- la capa externa que limita con las partes blandas vecinas es de nuevo más compacta - fig.55-a -, y guarda un cierto paralelismo al eje óseo. En la fig. 57-b vemos como aún perforada por vasos, es mucho más densa que la capa subyacente.

En las tibias estos procesos no aparecen tan avanzados - fig.57-c -, donde vemos que el área central tiene una trabeculación muy densa de orientación perpendicular a las corticales, y cuyos espacios vasculares son similares a los que aparecen en las costillas en inmediata vecindad con el cartílago. Al acercarnos a las epífisis va perdiendo en densidad la trabeculación, aumentan los espacios vasculares, que de todas formas no alcanzan nunca el volumen del callo costal.

Distalmente volvemos a la capa trabecular continua de eje paralelo a la cortical, que en las tibias - fig.57-d - muestra una estratificación celular múltiple, índice de que persiste la actividad de neoformación celular, lo que no encontramos ya en las costillas.

Las trabéculas tienen una morfología bastante uniforme con células - alargadas-ovoideas de eje paralelo al de la trabécula y dispuestas a intervalos regulares. La superficie aparece en general cubierta por una capa celular continua, de elementos aplanados que las separan de los espacios vasculares.

Las corticales a pequeño aumento tienen un aspecto más regular que en días anteriores, sus bordes tanto medular como periostal se han regularizado en casi toda su extensión y sobre ellos predomina la aposición ósea - fig.55-a -. Las corticales mismas aparecen ampliamente perforadas por vasos - figs. 58-a y b -. En algunos puntos - fig.58-b -, tienen gran tamaño las perforaciones, pero en torno al capilar, que se encuentra alejado de la antigua cortical, aparece una capa celular que se ha rodeado de una matriz que lo engloba. Podemos interpretar esta imagen como comienzo del relleno de los túneles perforados por las células que acompañaron a los capilares en su penetración cortical - fig.58-c -.

Hemos de analizar ahora los hallazgos recogidos en el treintavo día postfractura. No hemos encontrado grandes diferencias en relación a los datos referidos para el veintiun día, que acabamos de describir.

A nivel de las costillas, las masas cartilaginosas han desaparecido totalmente - figs. 59-a y b -. En tanto que en las tibias persiste por zonas, en especial a nivel del antiguo trazo y en la zona subperiostal en vecindad a éste - fig.59-c -. Sus celdas hipertróficas, van siendo invadidas desde capas más profundas por vasos, procedentes de la zona trabecular, y externamente limitan con las partes blandas por un estrato de 2-3 células fusiformes. Las áreas calcificadas, muestran una reabsorción como la de las figs. 56-b y 59-d. Queda después un área abigarrada por la aposición de matriz - fig.59-d - sobre los restos de la sustancia fundamental - del cartílago calcificado, que en otros puntos va siendo reabsorbido para dar lugar a una trabeculación regular como la que hemos descrito en otros puntos. Pero así mismo encontramos con frecuencia trabéculas que aún con una distribución uniforme muestran sus células separadas por una matriz pobre y unas cápsulas claramente destacables - fig.60-a -. En otras áreas - fig.60-b -, aparecen 2-3 células en grupos, rodeadas por una cápsula más marcada, entre masas de matriz de orientación diferente y cambiante en la cual apenas se distinguen células.

Las trabéculas van separándose entre sí - fig.61-a - creando gran -



des espacios vasculares, dando un aspecto mucho más ligero al callo que - externamente queda limitado por una capa ósea continua, como la descrita - en la fig. 57-b. Los espacios vasculares muestran en ocasiones aspecto me dular - fig.61-b -. En otros puntos, toman aspecto de maza, el eje central va rodeado en su vértice por grandes células que, donde entra en contacto con la superficie trabecular, le da aspecto irregular. A estas formas las podemos considerar por tanto frentes de penetración vascular, como ya he - mos descrito antes - fig.61-c -. Por fin hay áreas donde el capilar apare ce rodeado de una capa de células alargadas con un gran núcleo hipercromático, donde se aponen sobre una superficie ósea dispuesta en círculo en -- torno al eje vascular, y en cuya matriz hay 1 ó 2 estratos celulares que conservan la orientación circular. Estas áreas las consideramos como os - teonas en formación - fig.61-d -.

El mismo fenómeno aparece a nivel de los múltiples espacios vascula res de las corticales, como ya vimos en la fig.58-c. El fenómeno de pene - tración vascular permanece activo a pesar de haber comenzado la osteogéne- sis intracortical referida.

A nivel de las medulares persisten los fenómenos descritos, el puen te óseo que une ambos fragmentos va ganando en espacios vasculares, pero - sin que se haya restituido la permeabilidad medular completa, por lo que - no entramos en la descripción de sus trabéculas.

Las últimas piezas analizadas son las correspondientes a los 90 -- días de evolución tras la fractura. En ellas no aparecen a primera vista grandes signos de actividad celular. Las corticales no han recuperado su morfología normal y el callo sigue mostrando un aumento de volumen - fig. 62-a -. Externamente está limitado por una fina capa ósea, de aspecto si- milar a las corticales - fig.62-b - de las que se diferencia en que los -- grupos celulares presentan una disposición más irregular y hay zonas donde la matriz, entre estos grupos más densos, aparece con mayor afinidad tinto rial - fig.62-c -. A mayor aumento vemos que la morfología celular se -- acerca a la de los osteocitos típicos y que su cápsula no es muy prominen-

te. Entre ellas la matriz toma un aspecto laminar típico que en algunos - puntos se dispone en torno a los vasos formando estructuras osteónicas. -- - figs. 62-b y c -.

Entre esta capa ósea externa y las antiguas corticales persiste la trabeculación, que ya hemos descrito en todos los días anteriores, con muy poco volumen y entre ellas gran cantidad de tejido que toma el aspecto de la médula ósea grasa del adulto - fig.63-a y b -. Estas trabéculas, cuya orientación es más difícil discernir - fig.62-a -, tienen una superficie - cubierta por células muy aplanadas, mucho más que las descritas a los 21 y 30 días, hasta el punto que, a pequeños aumentos, no son claramente discernibles y sí aparecen a mayores aumentos - fig.63-c -.

Llama la atención que las trabéculas, más que la capa externa presenta unas zonas de su matriz que se tiñen muy intensamente y que en algunas zonas engloban cápsulas celulares que, cuando están completas, presentan células en su interior en buen estado.- fig. 63 - . Cuando no se conserva la celda, y sólo su reborde sobre esa matriz hipercromática, se apone una matriz de aspecto similar al hueso laminar de otros puntos, como vemos en dichas imágenes. Consideramos que estas zonas representan restos de cartílago calcificado que ha quedado englobado en la trabeculación , y una parte de sus células persiste viable.

Si la fig. 63-d nos muestra que la matriz laminar aparece también de una manera poco ordenada en torno a los restos de cartílago, en otros - puntos - fig.63-b - vemos que, entre ellos, se ha formado una osteona regular en lo que debió ser un espacio de reabsorción vascular como el de la fig. 61-c.

Esta estructura de las trabéculas nos permite diferenciarlas en sus puntos de anclaje sobre las antiguas corticales, que hacen en dirección - oblicua - fig. 64-a - donde a veces tienen mayor densidad. En otras regiones, donde la actividad de remodelado cortical fue más intenso y la apou

sición ósea se hizo en paralelo, la diferencia entre la antigua cortical y reacción osteogénica es más difícil de diferenciar - fig.64-b -.

La región del antiguo trazo de fractura ha perdido las peculiaridades de los días anteriores, y la unión de los fragmentos queda en ese punto formado por un sistema de trabéculas en las que aparecen los mismos caracteres que acabamos de describir, y que con un mayor volumen unen las antiguas corticales - fig.65-a -. Vemos además, que estas trabéculas se an - clan por indentaciones en las corticales - fig.65-b -. La fig. 65-c nos muestra estas trabéculas de unión intercortical un poco más alejadas y - de aspecto más macizo con el desarrollo de sistemas osteónicos que tien - den a tomar una orientación en el eje del hueso en estudio. Como las pie - zas por nosotros estudiadas no han curado en buena alineación, no podemos observar en ellas aún una clara continuidad de las corticales, en el sentido de la disposición de sus laminillas y sistemas osteónicos.

Las corticales aún muestran de vez en vez puntos de penetración -- vascular, como los descritos en días anteriores, pero como vemos en la - fig.66 - los espacios vasculares que se habían creado en las corticales y estaban bien desarrollados, a partir del 7 día parecen haberse rellenado totalmente por la reacción osteogénica cuyo comienzo vimos en la fig . 58-c.

## D I S C U S S I O N

## DISCUSION

Nos ocuparemos ahora de analizar los resultados obtenidos a lo largo de este estudio, y vamos a cambiar el orden de forma que, para poder interpretar los registros eléctricos derivados, hemos de considerar en primer -- término los hallazgos histológicos.

En el capítulo precedente hemos analizado los callos de las cost<sup>u</sup>llas y tibias, en los períodos de tiempo que habíamos fijado previamente, -- ahora vamos a ver cómo es la evolución de cada uno de sus componentes y cómo va cambiando su morfología general.

En primer lugar hemos visto que la reacción celular crece de forma -- paulatina y se extiende a lo largo de toda la diáfisis del hueso fracturado, con un espesor similar en los primeros momentos -- fig. 6,11-- para después -- continuar creciendo de manera continua en las proximidades del trazo de fractura en tanto que, en las partes más alejadas, va cediendo rápidamente el -- conglomerado de células -- fig.24,26-- . A consecuencia de ello se concentran las células y la sustancia fundamental en torno a la fractura, donde al multiplicarse durante más tiempo alcanzan mayor volumen tanto a nivel del ca--nal medular como en la cara externa de las corticales, subperiostealmente. -- Se constituye así, en esta vertiente, el manguito periosteal externo de Duha--mel. -- Fig.37,50-- . Esto coincide con los datos que reseñamos en la revi--sión de la literatura:

a) una fase de proliferación celular universal del periostio y endios--tio del hueso fracturado

b) al cabo de 3-4 días se establece una diferencia entre la región -- perifracturaria y el resto de la diáfisis, de forma que en la primera continúa la proliferación celular durante más tiempo y determina que el callo externamente tenga primero forma de huso, con su diámetro mayor a nivel de la línea de fractura -- fig.17-d --, y después se concrete aún más tomando entonces aspecto de anillo, lo que es muy marcado para las costillas a partir --

del 14 día -fig. 50-.

c) a nivel del conducto medular la reacción celular se mantiene durante todo el proceso, limitada a las proximidades de la fractura -fig. 24 -

d) al cabo de 90 días, plazo máximo estudiado por nosotros, no se ha recuperado la morfología normal de los huesos estudiados - fig. 62 -.

Si esto es el aspecto más general, nos interesa ahora considerar uno a uno los componentes que hemos encontrado en la evolución del callo.

I.- El hematoma, o mejor dicho el coágulo, alcanza un gran desarrollo en los primeros momentos, de forma que durante los 3 primeros días, y más acentuatadamente a las 24 y 48 horas, tiene una gran extensión tanto en el interior del canal medular como en el exterior. La continuidad del periostio se ha perdido, y los elementos hemáticos se extienden a las partes blandas. - figs. 4, 7-a y b, 8-a y c, 9-a -. A partir del cuarto día va en disminución el tamaño del coágulo. Al tercer día -fig. 14-a -, aparece ya claramente delimitado, lo que es aún más acentuado al quinto día a nivel de las costillas. En la fig. 24-a vemos que los restos del coágulo, por fuera de la cortical, están perfectamente delimitados y envueltos por la reacción celular de la vecindad, en esta fase el coágulo endomedular conserva una mayor extensión. Si a los siete días aún percibimos en alguno de los cortes su presencia, a los diez días de producida la fractura en la costilla de la rata -fig. 45-a -, ya no encontramos restos de hematoma, al igual que en las tibias de estos animales a los quince días. Estos datos concuerdan en general con los reseñados en la literatura ( 216,226,228 ).

Las células, y principalmente los hematies, sufren un proceso rápido de lisis de forma que el tercer día -figs. 14-c y e- forman grandes conglomerados, están aumentados de tamaño y empiezan a perder su morfología normal. Al quinto día no detectamos su presencia en los restos del coágulo.

Más interés tiene la evolución de las redes de fibrina, si en los primeros días aparecen infiltradas por las células -figs. 4-c y 5-a -, después van formando masas que toman un aspecto más compacto -figs. 14-e y 17-a, y fibrilar. Al comienzo, la orientación de estas masas es cambiante en la zona externa -fig. 4-c- y se disponen perpendicularmente al eje del hueso fracturado, dirección que se mantiene hasta el cuarto día para las costillas. En los días 5 al 7, los escasos restos de fibrina adoptan una estructura diferente, se pierde la orientación perpendicular, hay una masa central de disposición anárquica y, en torno a ella como en círculo, se forma una capa limitante externa -figs. 24-a y 37-c-.

En el canal medular la fibrina forma, a nivel de la línea misma de fractura, un telón perpendicular a las corticales que une entre sí, - fig. 14-e - y por dentro su orientación es en general paralela a las corticales -fig. 8-a-, aunque esta distribución no siempre es clara. Aquí se condensan las redes de fibrina al igual que en el exterior y aparecen antes cubiertas por la reacción celular que borra su disposición.

En las primeras fases -figs. 4-c y 5-b- la orientación perpendicular de la fibrina a la diáfisis fracturada parece debida a los efectos mecánicos de compresión del hematoma entre los extremos óseos impelidos por el tono muscular, como ya señalaba Knoefler ( 34 ). En estas primeras fases la red de fibrina está así mismo infiltrada por elementos celulares que después quedan a los lados -fig. 14-c-, para a continuación rodear dichas masas -fig. 17-a-, que se hacen entonces totalmente acelulares -fig. 24-c-.

Podemos considerar que la densificación de la fibrina, de acuerdo con otros autores, se debería por un lado a la pérdida de agua y por otro a su compresión por el tono muscular y por la reacción celular circundante -figs. 14-a y 24-c-. Si bien las células en su vecindad aparecen más apoltonadas, no nos ha dado la impresión, como postulan Ham y Harris, que el hematoma sea un impedimento para el progreso del callo, al menos en la rata, ya que, al sexto día creemos que ha perdido toda su importancia y es ampliamente desbancado por la reacción celular. Hemos podido encontrar en nues -

tro estudio, que las células usan a veces la fibrina como guía de su avance hacia el foco de fractura, así podemos interpretar las figs. 5-b, 9-b, 14-c, 14-d, 23-b, 33-a y 37-e. Con el VG los restos hemáticos toman en general una coloración amarillento-verdosa, y la matriz neoformada entre las células aparece de color rojo; hemos visto así, que la periferia del coágulo — no su porción central que es siempre acelular —, se infiltra por células que siguen la fibrina. Esta penetración es más clara a las 48 horas y 3 días - figs. 8-d, 9-b y 14-c -, pero ya a partir de este momento, y más claramente al 4º día la estructura fibrosa intercelular toma en muchos puntos el color rojo, por lo que podemos considerarlo como colágeno segregado por las células.

En consecuencia, la invasión celular del hematoma se hace en los primeros momentos siguiendo las redes de fibrina laxas de la periferia, y ya al 4º día las células que no contactan con la porción celular del coágulo, están rodeadas de una matriz fibrosa que toma las tinciones para el colágeno, que se deposita así consolidando las vías de penetración celular -figs. 14-c y 18-a-. Parece entonces que desde el entorno, y aprovechando su disposición más laxa, es invadido el coágulo por células que rápidamente se rodean de una matriz fibrosa que afianza la estructura subyacente. Conserva siempre acelular el centro del coágulo formado por masas de fibrina hasta su desaparición. Por tanto, y aunque imágenes como la fig. 24-a y c sugieren la formación de una barrera celular, creemos que tal formación no existe y que el coágulo desaparece rápidamente por invasión celular desde su periferia.

Los elementos responsables de esta invasión varían con el tiempo. - En los 4 primeros días, en especial hasta las 48 horas, predominan las células del infiltrado inflamatorio, granulocitos y células redondas, pequeñas, de gran núcleo hiper cromático - figs. 4-c, 5-b, 8-b, 8-e, 9-c, etc.-, que paulatinamente son sustituidas por células fusiformes que van ganando en frecuencia a medida que pasan los días, por células redondeadas, unas pequeñas de citoplasma claro y núcleo pequeño central y por otras grandes, ovoideas. En las fases tardías es posible ver en ocasiones células gigan-



tes -figs. 14-c, 23-b, 24-c y 25-b-.

Con el TC y el VG se observa que las células ovoideas, y en especial las fusiformes, de núcleo central hipercromático y prolongaciones citoplasmáticas en sus extremos, que en principio podemos considerar fibroblastos, son las que se rodean de la sustancia fibrilar antes descrita. Células que se confunden e imbrican con las que vamos a describir ahora para la reac -- ción medular y periostal.

El coágulo es, pues, invadido por un infiltrado inflamatorio agudo que con el paso del tiempo da lugar a una respuesta proliferativa celular de ti -- po conjuntivo que va a imbricarse con las células de origen medular y pe -- riostal del callo.

Por último y en relación con el coágulo, hemos de señalar que a partir del tercer día -fig. 14-a-, éste se rodea externamente por las células de la reacción inflamatoria y los elementos que infiltran las partes blan -- das circundantes, con lo que, por así decir, se cierra la comunicación del foco de fractura con el exterior, a pesar de no haberse regenerado un pe -- riostio propiamente dicho. Al comienzo, esta capa limitante externa está formada sólo por un estrato de 3-4 células -fig. 14-d-, dispuestas en paralelo a la cortical. Son células fusiformes pequeñas, al principio escasas. Con el paso del tiempo, la limitación con el exterior es cada vez más acenu -- tuado -figs. 24-a y 37-a-.

II.- Analizaremos ahora los fenómenos que tienen lugar a nivel de la cara cortical externa. Podemos dar por sentado que las células que allí se acan -- tonan proceden, al menos en parte, de la proliferación de las células mesen -- quimales indiferenciadas de la capa cambial del periostio, como vimos en la revisión de la literatura. Al no haber usado nosotros técnicas de marcado celular, no entramos en la discusión profunda del tema.

Como dijimos al principio de la discusión, a las 24 horas podemos ob

servar ya una proliferación celular que se extiende a lo largo de toda la -  
diáfisis del hueso afecto, estratificándose en una capa de 5-6 células fusi  
formes que se rodean de una matriz fibrosa, más abundante en la vecindad de  
la cortical -fig. 6-a-. A las 48 horas esta reacción sigue siendo poco lla  
mativa -figs. 11 y 12-, pero comienza a marcarse una ligera diferencia en -  
tre las regiones próximas y las alejadas al foco de fractura. En su vecin-  
dad el acúmulo celular es mayor y la capa, en inmediato contacto con la cor-  
tical, se rodea claramente de una matriz que separa las células entre sí, a  
la par que estas han aumentado de tamaño y tomado aspecto ovoideo.

Desde el tercer día y hasta el 21 tras la fractura, aproximadamente,  
para las tibias, y hasta el 15 para las costillas, se incrementa el espesor  
de esta reacción celular periosteal. A partir de ese momento dejan de cre-  
cer, y el conjunto que era de aspecto macizo va haciéndose poroso y poblán-  
dose de espacios vasculares, como encontramos a los 90 días de evolución -  
-figs. 50-a y 62-a- respectivamente.

La reacción periosteal no presenta un aspecto celular unitario sino -  
que, desde el 2º día y de forma más clara desde el 3º, se hace compleja, y  
en toda su evolución hemos encontrado una serie de zonas que se repiten y -  
van modificándose en el tiempo; como ya habían descrito, más o menos, otros  
autores previamente. Asada, Dieterich, Coutelier, Ham. etc., (216). Hasta  
el tercer día distinguimos dos capas y de ahí en adelante surgen tres, que  
se mantienen hasta el mes de evolución de la fractura.

La capa más interna a lo largo de toda la cortical se integra desde  
el segundo día por un estrato de 3-4 células grandes, ovoideas, de núcleo -  
excéntrico claro y un citoplasma granuloso, con frecuencia se ven prolonga-  
ciones celulares que se insinúan entre la sustancia fundamental -figs. 12-a,  
22, etc.. La matriz tiene un aspecto fibrilar bastante homogéneo, rodea a  
las células a las que engloba, y toma las tinciones propias del colágeno. -  
A medida que la capa se hace más antigua, con las tinciones empleadas por -

nosotros, se asemeja tintorialmente cada vez más a la cortical. No siempre comienza en las absolutas inmediaciones del trazo de fractura, sino que se retira unos milímetros el principio de la proliferación celular. El espacio que deja libre corresponde a la zona de arrancamiento periosteal por el traumatismo, y el área de cortical que quedará después sin osteocitos . --  
- Figs. 7-b, 14-b, 24-a, 31-a y 37-c -.

El estrato más externo está al comienzo en contacto directa con la capa que acabamos de describir -fig. 12-a- para después sólo hacerlo en la porción de la reacción periosteal próxima a las epífisis - figs. 22, 29-b , 51-c, 54-c-. Mientras crece el callo periosteal, está formada esta capa externa por un estrato celular múltiple de 5-6 planos. Sus células alarga-das tienen prolongaciones citoplasmáticas con frecuencia visibles. El núcleo es oscuro, grande y ocupa gran parte del cuerpo celular. De fuera hacia dentro, las células van ganando en tamaño y se van separando por la matriz que se interpone entre ellas -figs. 16-b, 19-c, 22, 27-d, 35-c y 45-c. Por el contrario, en las fases tardías del callo, cuando deja de crecer, - la capa externa disminuye de tamaño -figs. 51-b y 62-b-, se limita a 3-4 -estratos celulares; estas aparecen más pequeñas, más separadas entre sí, - el núcleo es menos cromático y no se observan figuras de mitosis como en - las fases previas.

Esta capa, desde los estudios de Tonna, sabemos con toda certeza es la responsable de la proliferación celular por división de sus elementos que emigran hacia la cortical y van separando el periostio de la misma. Las células tienen una morfología fusiforme, con un gran núcleo y pro-longaciones citoplasmáticas, es pues un aspecto poco diferenciado. En la actualidad se conoce como célula mesenquimal indiferenciada o preosteoblasto. Por los estudios de Manabe sabemos además con certeza, que de las -células resultantes de las divisiones de las capas más externas van a derivar no sólo los osteoblastos, a través de una serie de pasos intermedios - como ahora describiremos, uno de los cuales sería el preosteoblasto, sino, además, los condroblastos, que originarán el tejido cartilaginoso periosteal y en cuyas etapas intermedias hay que aceptar, así mismo, la existencia de

un precondoblasto.

La región más interna del estrato externo va cambiando de aspecto y da lugar a una nueva zona intermedia en la porción central del callo. Las células fusiformes de la capa externa, aumentan de tamaño, se tornan redondas ovoideas y se separan entre sí por un acúmulo progresivo de sustancia fundamental. El aspecto varía según el momento y el lugar. Al principio las células son ovoideas grandes, el núcleo se hace excéntrico y más claro, con nucleolos, el citoplasma es granuloso. Entre las células se deposita una matriz que toma el verde con el TC, y el rojo con el VG, y que separa las células entre sí. Todo ello tiene un aspecto de tejido joven. Al no haber hecho tinciones específicas, no podemos dilucidar en este momento cuales zonas son osteoide y cuales tejido cartilaginoso joven.-Figs. 15-b, 15-c, 18-a, 20-b, 20-c-.

A partir del 4º día, esta zona intermedia de la reacción periosteal se diferencia más claramente en varios tipos tisulares. En las zonas más alejadas del foco fracturario, surge un tejido de caracteres similares a la capa más interna en contacto directo con la cortical. Las células se ordenan relativamente en capas, y se rodean de una sustancia fundamental de aspecto fibroso, que se tiñe positivamente para el colágeno. Se forman así a modo de trabéculas en cuyo interior quedan parte de las células de morfología ovoidea, algo más pequeñas que las que acabamos de describir más arriba. El núcleo sigue siendo claro, excéntrico, y el citoplasma que no es tan granular presenta prolongaciones que en algunos puntos se ven contactar con las células vecinas. En unas áreas las células se distribuyen regularmente en tanto que en otras unos puntos de la matriz son más celulares que otros. La superficie de estas formaciones están cubiertas por células que unas veces tienen el aspecto que acabamos de describir, en tanto que en otros son más aplanadas, con un núcleo central -figs. 17-d, 19-a, 28, 33-b, 35, 39-c, 46-b, 47-c, 51-c, 62-a, 63-a-. Entre estas porciones densas, aparecen otras más laxas, con las células dispuestas en estratos -

en torno a los espacios vasculares, de los cuales nos ocuparemos mas adelante.

Estas formaciones trabeculares las podemos considerar como hueso neo formado, similar al que aparece, como veremos, a nivel del canal medular y cuya orientación va cambiando en la región periosteal por efecto de la penetración vascular.

En la vecindad del foco esta región intermedia se estructura de forma diferente. Surge un tejido cartilaginoso muy abundante tanto en las -- costillas como en las tibias, donde tarda más tiempo en desaparecer. Al -- igual que las trabéculas óseas, el área cartilaginosa surge por diferenciación en este sentido de las células del estrato externo. Estas se hacen re dondas, el núcleo se hace excéntrico, presenta un nucleolo y las células se van rodeando de una matriz que tiene un aspecto mucho más uniforme que el -- de las trabéculas, y que toma con mucha menor intensidad los colorantes pro pios del colágeno. La sustancia fundamental forma verdaderas cápsulas en -- torno a las células --figs. 18-b, 27-b, 27-c, 34, etc.--. Hay un momento al 4º día, que la matriz y el aspecto del conjunto puede hacer pensar que se -- trata de trabeculación ósea --figs. 19-a y 20-a--, pero por su ubicación y la evolución posterior, pensamos que no es más que un área de diferenciación cartilaginosa en vías de formación, que aún no ha adquirido las características de los días siguientes.

A partir del 5º día las células van creciendo hacia la cortical, adquiriendo en las áreas centrales un gran tamaño. En estos puntos la cantidad de matriz interpuesta entre las lagunas celulares disminuye y queda en muchos puntos limitada a finos tabiques. El núcleo celular se desplaza, es poco cromático, conserva un nucleolo y el citoplasma se llena de vacuolas -- transparentes con las tinciones empleadas. Suele existir una célula por -- cápsula, pero en ocasiones aparecen dos células por laguna. Las células to man en estas áreas una disposición columnar hacia la cortical, bastante re gular.--Figs. 26-a, 27, 34, 37, 39-a y b, 47-a, 48, 52-a, etc.--.

El tejido cartilaginoso alcanza su máximo desarrollo en las costillas el 10º día y en las tibias el 14º día, a partir de los cuales y por invasión vascular, disminuye rápidamente su presencia de forma que al mes sólo quedan en las porciones más externas del callo vestigios de su existencia -fig.59-c-

En el séptimo día postfractura, en algunos puntos del tejido cartilaginoso donde las lagunas alcanzan gran tamaño, aparece su cápsula teñida intensamente, de color oscuro y las células incluidas tienen más vacuolas, algunas incluso se fragmentan y no es posible distinguir su núcleo. Interpretamos estas áreas como de cartilago calcificado, y su presencia de una u otra forma se mantiene hasta el final del proceso. Alcanzan mayor desarrollo al décimo y catorceavo día -figs. 48-c, 52-b y c, 56-b, d y e-.

El cartílago calcificado se localiza entre las zonas de celdas hipertróficas y la zona de penetración vascular- fig. 48-c -, aunque no es obligada su presencia, al contrario que en las epífisis, para que se produzca la penetración vascular. Encontramos a veces, y antes de que ocurra la invasión capilar -fig. 52-e-, que varias de estas lagunas calcificadas confluyen entre sí y aparecen repletas de restos celulares.

III.- Para comprender el devenir del cartílago y del callo en general, tenemos que conocer su vascularización, pero antes vamos a revisar los fenómenos registrados en el canal medular.

Hemos visto que el hematoma se entiende igualmente en el mismo y que la reacción celular que lo circunda es similar a la localizada en la periferia del coágulo. En la medular sana surge pronto una intensa proliferación celular -figs. 9-b y c, 17-b, 23-a y b, etc.- que a partir del cuarto día está formada por unas células ovoideas de núcleo oscuro -fig.23-b-, que se colocan entre los restos hemáticos y que, ya antes -fig. 16-c- se rodean de una matriz fibrilar. Al quinto día se diferencian en las cercanías del coágulo, en el interior de este acúmulo celular, trabéculas -fig. 29-a-. En la imagen 29-c, a mayor aumento observamos que las células tienen todas aspecto

fusiforme con prolongaciones citoplasmáticas visibles con frecuencia y un núcleo hipercromático. Entre las células distinguimos abundantes vasos y, además, una sustancia fundamental sobre la que se aponen las células que en parte quedan incluidas en su interior. La matriz es intensamente positiva para las tinciones del colágeno, y este hueso así neoformado toma una orientación paralela al eje de las corticales.

Esta trabeculación que conserva el mismo aspecto a lo largo del tiempo, con su paso, se va permeando por vasos que se acercan al antiguo trazo de fractura -fig. 50-c, 55-c, 59-b, 61-b- y refuerzan la disposición paralela de las trabéculas. Hasta el séptimo día en las costillas, la reacción celular medular no atraviesa el hematoma para unirse a la proliferación del --otro fragmento, proceso que se completa al décimo día -fig. 45-a-. Ya al --sexto día se establece en torno a los extremos fracturarios una continuidad entre el callo medular y el periostal, formando el llamado callo intermedio -figs. 31-b y c-.

Junto a la reacción celular medular central que se diferencia directamente en hueso trabecular, hay que considerar la respuesta de las células de la superficie endostal, que así mismo proliferan para dar lugar a una capa de hueso de 3-4 estratos celulares que cubren internamente las corticales --figs. 10-a, 16-b, 23-c, 29-a y b-. De acuerdo con los autores que se han ocupado del tema, salvo en muy raras excepciones como la fig. 42-a, no hemos encontrado cartílago a nivel del canal medular, lo que está en relación con la abundante vascularización que encontramos de forma permanente a ese nivel.

IV.- Para el estudio de la vascularización no hemos recurrido tampoco a --técnicas especiales que nos hubieran permitido una visión más completa del --problema.

A nivel de la medular a las 48 horas observamos la existencia de una vascularización permeable -fig. 9-b y 9-c-, que aumenta después aunque el --tapón celular descrito impide hasta el décimo día una aproximación real al --oco, que es bien atravesado por los capilares a los veintiún días de la --ratura -figs. 23-a, 25-a, 33-b, 38-a y b, 46-a, 50-b, 55-c y 59-b-. Por --anto, la medular está bien irrigada desde el principio en la región de la

respuesta proliferativa celular y avanza con ella hacia el trazo de fractura que atraviesa y se une con los vasos del fragmento opuesto hacia el veintiún día para las costillas. Como hemos señalado, no hemos encontrado el canal medular totalmente repermeabilizado a los noventa días, seguramente por la gran deformidad con la que han curado los huesos aquí analizados.

La vascularización del callo periosteal es más compleja. El estrato externo y la reacción celular en torno al coágulo muestran rápidamente una amplia vascularización ya detectable a las 48 horas y que alcanza un gran desarrollo en las partes blandas vecinas -figs. 8-e, 14-c, 17-c y d, 19-c, 27-d, 32, 45-b y c-. Hasta el décimo día la capa más externa de la reacción periosteal y las partes blandas vecinas muestran un claro aumento de la circulación.

En algunas de estas imágenes es posible ver como células del mismo aspecto que las que integran el callo en esta zona, parecen desprenderse de la pared capilar o incluso salir de su interior -figs. 8-e y 19-b-. En estos puntos se manifiesta, así mismo, una mayor densidad celular en torno a los vasos -fig. 27-d-, pero pensamos que no son datos suficientes para considerar, como postularan Trueta, Dieterich, etc., el origen vascular de todas las células del callo. Pensamos que los datos de Manabe, Scott, Tonna, etc., en favor de su origen cambial son más conclusivos al respecto, aunque no podemos descartar un aporte vascular, bien a partir de células circulantes, en especial en las vecindades del coágulo las células móviles del S.R.E. que localmente junto a macrófagos se diferencian en fibroblastos; bien a partir del endotelio, una parte de cuyas células se desprendería durante la neoformación capilar y contribuiría a la formación del callo, pero creemos que los capilares detectados son en las primeras fases del callo insuficientes como para explicar su producción global.

Las áreas del callo cercanas a las epífisis presentan así mismo una buena vascularización que no se limita a los estratos más externos, sino que llega hasta la misma cortical y permite que desde un principio, en su entorno, se diferenciendirectamente trabéculas óseas, como hemos descrito en los



hallazgos y vemos en la figs. 21-a y b, 37-b, 41-a y b, etc.. En estos puntos los vasos se dirigen bien oblicua o bien paralelamente a la cortical, - determinando así la orientación de las trabéculas -fig. 51-c-.

Más difícil es la vascularización de la porción central del callo periostal en la región cartilaginosa. En una zona muy densa, desprovista de vasos prácticamente, que sólo aparecen de muy tarde en tarde -figs. 39-b, - 48, 52-a-. Con el tiempo el cartílago disminuye de volumen, ya que, desde la capa más externa cuando esta deja de proliferar y, sobre todo, desde las áreas vecinas, penetra la vascularización que va a ser el motor del remodelado del callo.

Al cuarto día vimos -fig. 21-a- un gran vaso que se dirigía en pleno callo hacia la cortical. Al sexto día comienzan a hacerse más manifiestos los fenómenos de penetración capilar -figs. 34-c y 35-, en el área de cartílago. El proceso se incrementa claramente al séptimo día en que vemos tomas diferentes aspectos -fig. 39-e-, y a mayor aumento en las figs. 40-b y - 41-a. A partir del catorceavo día para las costillas y veintiuno para las tibias, el frente de invasión está perfectamente organizado adoptando forma de "V", de vértice a nivel del trazo de fractura y con una morfología similar a la del cartílago de conjunción, pero sin una disposición tan perfecta y sin la presencia universal del cartílago calcificado más arriba descrito. -Figs. 51-a, 52-b-.

En las imágenes 40-b, 41-a, 48-d, 52-c, 56-c y e, vemos diferentes aspectos de esta invasión. Las paredes de las lagunas se rompen estén calcificadas o no, y confluyen entre sí formando mayores espacios vasculares - limitados por la antigua matriz cartilaginosa - 40-b, 52-b -. No hemos visto los vasos en su penetración precedidos en ningún momento por células multinucleadas. Aparecen unas células redondas ovoideas grandes, que forman un frente tras el cual viene el capilar envuelto en 1-3 capas de células fusiformes -figs. 21-a, 41-a-. Como consecuencia de la penetración vascular no desaparece todo el tejido cartilaginoso, sino que sobre él se apone una

nueva capa de tejido que se calcificará, formando unas trabéculas cuyo núcleo es en muchas ocasiones cartilaginoso, cuyas células persisten viables y cuyos restos perduran hasta los 90 días. Se forma así una especie de esponjosa primaria, que a su vez sufrirá un nuevo proceso de remodelado -figs. 53-a, 56-b, c, d, e, 63-a, b, c -.

Junto al cartílago, las trabéculas óseas depositadas y la esponjosa primaria que acabamos de describir, sufren también una invasión vascular que va a determinar:

1. una reorientación de las trabéculas
2. una menor densidad ósea del callo periostal que se medulariza
3. una estructura de hueso laminar de las trabéculas neoformadas.

Observamos la reorientación de las trabéculas en las figs. 51-b y c y 55-a, que a su vez nos muestra como el callo en las porciones más alejadas - del trazo pierde en densidad alcanzando su grado extremo en la fig. 62-a. -- En la imagen 55-a vemos, como ya había descrito Coutelier, que en paralelo y en la vecindad de la antigua cortical se ha labrado un amplio canal vascular que será el que inicie la medularización del callo que tan desarrollada encontramos a los noventa días, momento en que los espacios intertrabeculares se han rellenado de médula grasa adulta. - fig. 63-b -.

La penetración vascular en las trabéculas tiene lugar de una manera similar a la que hemos descrito para el cartílago, es decir, los vasos van precedidos por un frente de células entre las cuales no hemos encontrado ca si nunca células gigantes. Tras este frente vienen los vasos que se acompa ñan de una atmósfera de células fusiformes. El frente celular está formado por grandes células mononucleadas como las descritas a nivel del cartílago - figs. 40-c y d, 56-c, 61-c -, esta última la podemos considerar como - aradigma de las cabezas de penetración vascular, similar a las "cutter eads" descritas por Olerud, Dhem, Lacroix, etc.. Cuando el vaso pene ra, al comienzo sus células están directamente apuestas sobre la - -

matriz del canal labrado, pero si este se ensancha, en especial en aquellos puntos donde va a formarse una estructura muy esponjosa, puede quedar separada por varias capas celulares.

Después de labrados los canales en las antiguas trabéculas, sean de esponjosa primaria, es decir, con un núcleo cartilaginoso de osificación - desmoide directa, se neoforma hueso en torno a los vasos, núcleos de los canales perforados, de tipo lamelar osteónico adulto. Podemos considerar la fig. 61-d que representaría la continuación de la imagen 61-c, en el sentido que el frente de perforación ha desaparecido. El vaso central está rodeado por unas grandes células ovoideas, similares a las halladas en los puntos - donde se forman las trabéculas. Las células están sobrepuestas sobre una - matriz cuyas fibras parecen tener disposición circular y engloba a dos ca - pas de células que parecen guardar también la disposición circular. Pode - mos entonces interpretar esta estructura como una osteona en vías de forma - ción. Imágenes similares encontramos a nivel del cartílago ya a los diez - días -fig. 48-c-. En la reacción periostal aparecen más tardíamente, hacia el mes de producida la fractura -fig. 61-d-, y con frecuencia en el remode - lado de las trabéculas, a los 90 días -figs. 63-b, 64-b-. En este mismo -- sentido hemos de interpretar, además, las figs. 27-e y 42-c presentes al 5º y 7º día, aunque no se distinga una estructura vascular en su interior.

V.- El último aspecto de la penetración vascular que tiene importancia es la permeación de las corticales, proceso que hemos encontrado muy desarro - llado hasta el punto de borrar en algunos sitios su fisonomía normal, pero sin llegar en ningún momento a perder su individualidad, como postula Coute - lier.

No hemos encontrado datos de actividad franca hasta el 6º día -figs. 35-a, b y c-. A partir de este momento la penetración vascular de la corti - cal va en aumento hasta las tres semanas, momento en que comenzamos a ver - procesos de neoformación ósea en los canales previamente labrados -figs. 43, 44, 49, 59. Es de señalar, además, que si bien la penetración desde la me -

dular es la ruta preponderante, también se horada la cortical desde la reacción periostal, como vemos en las figs. 54-a y b.

Los canales se abren unas veces como hemos descrito hasta ahora, es decir, el vaso va precedido por un frente de células mononucleares -fig. 44-. En otras ocasiones se constituye el frente a base de células multinucleadas, muy bien desarrolladas, que en la vertiente medular las encontramos al tercer día -fig. 23-d- y se repiten posteriormente -figs. 43-d y c, 49-d, 54-a y b. En estas últimas aparecen así mismo en la cara periostal de la cortical.

Aunque los canales vasculares surgen a lo largo de toda la diáfisis -fig. 49-c, 54-c-, son más frecuentes en torno a la línea de fractura, donde las corticales presentan sus lagunas osteocitarias vacías, llegando a separar los fragmentos muertos del resto de la diáfisis -fig. 43-a-.

A partir de los 21 días, y más claramente al cabo de un mes de evolución, empiezan a rellenarse los túneles horadados -figs. 58-b y c, 64-b-, - hasta desarrollar nuevas osteonas en las antiguas corticales, que se delimitan perfectamente del hueso antiguo.

En consecuencia, el remodelado óseo que hemos estudiado someramente, aún sin la ayuda de marcado con tetraciclina, comienza de forma muy precoz y se extiende más allá del período de tiempo estudiado por nosotros, lo que consideramos se debe al gran volumen alcanzado por el callo, la gran cantidad de cartílago que se desarrolla en su interior y la deformidad con que curan la mayor parte de las fracturas, resultado de la falta de inmovilización de las mismas.

Una vez analizados los datos histológicos, podemos encarar el problema de los potenciales registrados.

A lo largo de todo el estudio llama la atención la dispersión de los datos obtenidos. Esta gran dispersión hace que las desviaciones y los erro

res típicos sean grandes de forma que las muestras recogidas estén poco agrupadas y que registros que en una primera aproximación tienen valor, carecen de significado estadístico y no son válidos para un análisis probabilístico. Esto es especialmente llamativo en los grupos más pequeños, como por otro lado es previsible desde un punto de vista estadístico.

Una parte de esta dispersión viene dada por los electrodos, pero en los métodos señalamos que el tipo de electrodos empleado era mucho más estable que los electrodos de plata utilizados normalmente en fisiología para otros registros. En la TABLA I hemos recogido el potencial interelectrodo previo, y vimos que éste superaba los 3,5 mV en 21 ocasiones a lo largo de los 283 grupos analizados. Los electrodos de Ag-Ag-Cl usados y unidos con la superficie de medida a través de una solución salina, reúnen las condiciones exigidas para los electrodos de medida; la diferencia de potencial entre metal y solución tiene que ser estable y además los electrodos tienen que ser impolarizables.

En los hallazgos señalamos que en nuestro parecer la anestesia incidía de forma poco manifiesta sobre los registros. No hemos hecho un análisis cuantitativo a este respecto. En la mayor parte de los animales el nivel de anestesia influía poco si se acercaba a estado vigil, por el contrario aquellas ratas que murieron por un exceso de barbitúrico durante el período de registro, mostraban un descenso de los valores y un aplanamiento de la curva derivada por lo cual los consideramos como muertos y los excluimos del análisis estadístico.

En los tres primeros animales de estudio, y en el que habíamos realizado previamente, hemos podido constatar la existencia de una diferencia de potencial a lo largo de las diáfisis tibiales por nosotros analizadas. En las gráficas hemos visto la morfología que adopta esa corriente eléctrica a lo largo del hueso, y al contrario que Friedenber<sup>g</sup>, no hemos encontrado más que un punto negativo, en la metáfisis proximal de la tibia en relación a su epífisis. La colocación de ambos electrodos sobre la epífisis proximal dio un valor positivo que registramos en nuestro estudio previo, pero que

no repetimos en éste por no sobrecargar de datos el análisis.

A partir del tercio proximal de la diáfisis, el registro se hace positivo y, desde el punto medio, adopta una forma en meseta -GRAFICA II-. La metáfisis distal, que corresponde al PUNTO IV de este estudio, no apareció -negativa en ninguna ocasión. No hemos invertido la posición del electrodo -control, es decir, colocándole sobre la epífisis distal y haciendo el registro al contrario, pero suponemos que la metáfisis distal se haría entonces -negativa respecto a dicha epífisis.

La magnitud de los valores registrados, conservando el periostio, -- coincide con los datos de Weigert y Friedenberg para la metáfisis en el conejo, en tanto que la diáfisis aparece en su región central con 5,5 mV como -media en nuestro estudio y de 2 mV en el de Friedenberg, con una desviación típica similar para ambos análisis.

Una vez demostrada la presencia de un gradiente eléctrico a nivel de las tibias, nuestro paso siguiente fue comprobar la influencia que podría tener sobre el mismo la presencia del periostio, la idemnidad de los troncos -nerviosos y la vida del animal.

Más arriba vimos que Friedenberg, al contrario que Becker, obtenía -unos registros de mayor intensidad tras desperiostizar el hueso. Nosotros -hemos hecho el análisis en primer término sobre huesos idemnes, encontrando que, salvo para la metáfisis, la presencia del periostio tiene gran valor, -ya que, la denudación ósea determina un aumento estadísticamente muy significativo de los valores obtenidos que se duplican para la región diafisaria --GRAFICA II-.

El paso siguiente fue la sección de los grandes troncos nerviosos que condiciona una caída en la diferencia de potencial de los registros diafisarios, no así del PUNTO "0". Con ello el incremento registrado tras la desperiostización parece perderse al eliminar el influjo nervioso. El análisis -estadístico nos demostró que había una diferencia significativa entre el hue

so denervado y el desperiostizado para la región diafisaria y no para las metafisarias, que por el contrario se hicieron estadísticamente distintas al - comparar el hueso idemne con el hueso denervado y desperiostizado.

El tercer parámetro analizado ha sido la influencia de la vida, por - así decirlo, sobre estos potenciales. Al extraer las tibias de los animales previamente muertos, perdían junto a su conexión neural su aporte nutricio . Por otro lado sabemos desde Axhausem, que el número de osteocitos muertos a la media hora de extraído el hueso es importante. En estas condiciones la - curva se hace plana y los valores se aproximan a cero -GRAFICA II-.

La interpretación de estos datos es difícil, y no podemos con nuestro estudio dar una explicación satisfactoria global.

Al efectuar las medidas en un animal inmovilizado y anestesiado eliminamos de entrada los influjos mecánicos habituales para el hueso: tracción , compresión, flexión y cizalla. Por los estudios del comportamiento mecánico del hueso sabemos, siguiendo a Sedlin, que presenta características suficientes para considerarlo como un material viscoelástico. Esto implica que la - curva de esfuerzo-relajación no es recta, y que la vuelta a la forma normal exige un tiempo tras la retirada de la fuerza aplicada, pero estos fenómenos no influyen en las condiciones experimentales diseñadas por nosotros, y como ya hemos comentado más arriba, podemos eliminar en consecuencia los factores piezoeléctricos y similares que de alguna manera regulan la estructura del - hueso idemne.

Sobre el hueso en reposo influyen otra serie de factores que pueden - determinar, al menos en parte, los fenómenos eléctricos registrados. La muerte del animal y la extracción del hueso hacen caer la diferencia de potencial a valores cercanos a "0". Este hueso en reposo conserva una parte de sus - elementos celulares viables, que podrían explicar el debilísimo registro obtenido, pero nos parece una idea difícil de defender y no hemos realizado por otro lado registros sobre huesos desecados para comprobar dicha aseveración.

Al margen de la vida osteocitaria el hueso presenta una vascularización y una inervación.

Friedenberg y Brighton consideran la vascularización como la fuente principal de los potenciales registrados y afirman que las áreas negativas corresponden a los puntos de mayor vascularización, es decir, las metáfisis. El punto negativo por nosotros registrado a dicho nivel concuerda con dichos autores; a su favor está, así mismo, que la desconexión total del hueso del organismo hace caer el registro a cero.

La denudación ósea determina que el valor del punto "0" sea menor, de -3,6 mV cae a -1,8. Aunque la diferencia no es estadísticamente muy significativa, podemos interpretar este si consideramos que la desperiostización de la metáfisis lesiona más su vascularización que en la diáfisis, cuya arteria nutricia creemos no haber lesionado.

El análisis del flujo vascular en el hueso adulto normal indica la existencia de varios territorios: a) área metafiso-epifisaria; b) área diafisaria suplica por la arteria nutricia, con una circulación centrífuga preponderante desde el canal medular hacia la cortical y drenaje a través de los vasos periostales. Siguiendo a Digby, esta disposición podría explicar la morfología del registro obtenido en el hueso idemne. El predominio del flujo centrípeto y su mayor volumen a nivel de la metáfisis condiciona el signo negativo, en tanto que la positivación de los potenciales diafisarios se justificaría por un predominio del flujo centrífugo a este nivel.

Al no haber realizado estudios de la vascularización ni intentos de supresión, no podemos analizar más este factor que queda así como un problema abierto.

El otro gran determinante a considerar es la inervación. A pesar de los estudios de De Castro, Hurrell, etc., no existe un análisis sistematizado de su estructura nerviosa. Existe una inervación rica del periostio, y



De Castro demostró la presencia de fibras amielínicas en los canales de Havers acompañando a los vasos, cuyas terminaciones entraban en contacto, en ocasiones, con los osteocitos/osteoblastos. Un estudio sobre la presencia de terminaciones sensibles y la relación de inervación de las células óseas, no existe en nuestro conocimiento.

Pero junto a la posible influencia directa del sistema nervioso sobre el hueso, la forma más conocida de su actuación es a través de la musculatura. Es perfectamente sabido que las alteraciones en la neurona motora inferior determinan una atrofia ósea con disminución del grosor y una menor cantidad de tejido óseo; los huesos crecen menos y presentan una menor resistencia a la rotura. La mayor parte de estos fenómenos se han explicado por la atrofia muscular, y es muy difícil deslindar la existencia de una actuación nerviosa directa sobre el tejido óseo. Otro posible mecanismo de acción es a través de la vascularización. Los trastornos de la inervación vegetativa en las poliomielitis inciden también desfavorablemente, ya que, las simpatectomías realizadas antes de los 11 años en los niños, condicionan una menor atrofia ósea. Navarro ha demostrado por otro lado que las modificaciones en el callo de fractura en miembros denervados, tanto experimental como clínicamente, no son muy manifiestas en relación al proceo normal.

Más arriba vimos que Becker, siguiendo a Singer, considera la inervación como la fuente principal de los potenciales registrados sobre la superficie ósea. En nuestro estudio hemos analizado sólo los efectos agudos de la denervación sobre los fenómenos eléctricos, lo que por un lado impide conocer su repercusión a larga distancia, pero tiene la ventaja de que en algún modo elimina el factor de atrofia muscular. La anestesia disminuye asimismo el influjo del tono.

En nuestro análisis hemos encontrado que la sección de los grandes troncos nerviosos determina una caída del voltaje registrado, pero este no desaparece como postula Becker, sino que se vuelve a un nivel similar a los registros efectuados sobre el hueso idemne para las diáfisis, pero no para

las metáfisis.

No hemos derivado los potenciales denervando miembros sin desperiostizar la tibia con lo que la interpretación de la caída de voltaje es difícil. Podemos considerar que la sección del periostio y la denudación ósea produce un potencial de lesión por alteración de la inervación periostal, que se suma al registrado previamente. La sección de los troncos de alguna manera — elimina dicho potencial de lesión. De todas formas, el voltaje derivado es superior al obtenido sobre el hueso ídemne, con lo cual disintimos de Becker en atribuir a los troncos nerviosos y su flujo electrónico el origen total — de los fenómenos eléctricos hallados.

Al margen, cabría la posibilidad de que la interrupción nerviosa modificara en algún sentido la vascularización del miembro, pero el registro es demasiado precoz y en todo caso la sección produciría un aumento del flujo — sanguíneo que acentuaría los valores negativos de la curva.

El factor siguiente a analizar es el periostio. La denudación determina un claro incremento de los potenciales. Ya hemos visto que a nivel de la metáfisis, por el contrario, cae el valor que hemos interpretado consecuencia de la alteración de la irrigación a dicho nivel. El aumento del voltaje en la diáfisis ha sido explicado por Friedenberg y Brighton y Becker como resultado de un potencial de lesión — lesión celular y lesión neural —. La lesión celular determina un trastorno iónico local que podría modificar la — respuesta, y el potencial de lesión neurológico es un fenómeno bien conocido en fisiología. El cambio discreto en la morfología de la curva eléctrica es más difícil de entender como consecuencia sólo del potencial de lesión.

Otra interpretación del hecho encontrada en la literatura, es que considerando al hueso como un conductor, con una porción central hueca — la medular —, en la que fluyen cargas, el potencial derivado sobre el mismo aumenta en el momento de quitar una de las cubiertas aislantes, que sería el — periostio, y justificaría para la porción diafisaria del hueso el aumento — del voltaje registrado conservando la morfología de la curva.

No entramos en el desarrollo de la teoría de conductores al ser el hueso, en principio, un tejido no excitable. Si lo comparamos a un conductor, habría que considerar los potenciales derivados de tipo electrotónico y el periostio, al disminuir la intensidad del registro, como una membrana capacitante.

El paso siguiente fue el estudio de las modificaciones del comportamiento eléctrico tras la fractura y su evolución en el tiempo.

El análisis de las GRAFICAS IV, IX y X así como de los valores estadísticos, presentan un cambio en la morfología y en la magnitud de los valores obtenidos.

La elaboración estadística de los datos muestra que por el efecto de la fractura en los registros hechos con el periostio hay una diferencia clara en torno al foco, de manera que se rompe la disposición en meseta y el punto II se hace diferente al 0, I y IV, aparece además un aumento global del voltaje registrado. En este momento la denudación ósea no aporta grandes modificaciones desde el punto de vista estadístico, pues aunque el valor de los registros es más elevado, no es tan marcado como en las tibias en que la medida se realizó sobre el periostio, y la diferencia con el hueso normal desperiostizado es escasa. La rotura del esquema eléctrico es también perceptible en este segundo grupo de medidas, y el punto II se individualiza en relación con los demás, salvo con el punto III, es decir, a ambos lados de la fractura. El registro con el electrodo de referencia colocado sobre la epífisis proximal, no indica diferencias significativas a través del trazo fracturario.

En consecuencia se producen dos hechos. En primer lugar un aumento de la diferencia de potencial; en segundo una rotura del esquema eléctrico con individuación del extremo distal del fragmento proximal, respecto al resto de la diáfisis. Y en tercer lugar una diferencia estadísticamente válida entre los registros sobre el hueso idemne y el hueso recién fracturado.

La interpretación de estos hechos no es clara. En general, siguiendo un criterio físico, se puede considerar que el exceso de energía que se ha acumulado en el hueso en el momento de la fractura se traduce en un incremento de la energía registrada a nivel del hueso. Aumento de energía que es máximo en torno al foco de fractura, de forma que hay un cambio en el valor -- obtenido en el punto II, al margen de la presencia del periostio, que rompe el esquema eléctrico en meseta registrado a nivel de la diáfisis.

La energía utilizada para producir la rotura, como dijimos en los métodos, no la controlamos al aplicarla con los dedos, con lo cual nos acercamos más a un mecanismo de producción real de las fracturas en la vida diaria, pero desde el punto de vista experimental no hemos podido analizar su valor. Tendría interés comprobar si la aplicación de una fuerza en la zona del comportamiento elástico del hueso, produce un aumento del voltaje en los puntos analizados, al margen de los fenómenos piezoeléctricos que pueden surgir, y que desaparecen con una diferencia de potencial de signo opuesto, en el momento que cesa la aplicación del esfuerzo.

Los estudios mecánicos del hueso han demostrado que se puede obtener una curva que relacione la fuerza aplicada por unidad de superficie --stress-- con la deformación longitudinal de dicho cuerpo --strain--, y el área entre dicha curva y la abscisa en el momento de producirse la rotura expresa la energía absorbida por el hueso.

Por otro lado Sedlin afirma que al ser el hueso un cuerpo viscoelástico, en cada ciclo de aplicación de una fuerza disipa energía, y sus estudios y los de Evans, Currey y Mc Elhaney, han demostrado que según a la velocidad a la que se haga la carga del hueso, varía la energía absorbida, si el es -- fuerza es rápido acepta más energía, de forma que bajo una carga rápida la energía absorbida en el momento de la fractura es mayor, aunque la deformi-dad sea muy similar.

Becker postula que en el momento de producir la rotura queda al exceso de energía aplicado al hueso absorbido, liberándose a continuación en -- forma de dipolo. Nosotros no hemos podido observar la dispocición de car-gas descritas por él con aparición de un dipolo en que las cargas positivas se localizan en los extremos fracturarios y las negativas en las diáfisis - a ambos lados; pero consideramos que la energía absorbida por el hueso en - el momento de la rotura es la responsable de los cambios eléctricos que he- mos señalado.

Otro dato no reseñado en la literatura es que en este momento la presencia o no del periostio carece de valor, y los registros efectuados sobre huesos fracturados previamente desperiostizados, mostraron sólo un ligero aumento del voltaje, y una diferencia del punto II. Esto parece indicar la -- existencia real de un potencial de lesión tras la apertura y rechazo del periostio.

La interpretación de estos datos queda por tanto abierta al deber analizarse más profundamente la relación entre los potenciales registrados y la sollicitación mecánica a la que había sido sometido el hueso previamente.

En los hallazgos vimos que en los días siguientes a la fractura apare- cían una serie de oscilaciones en las diferencias de potencial registradas - GRAFICAS IX y X. Oscilaciones que son más marcadas para los puntos diafi- sarios y que, al margen de la distinta magnitud condicionada por la presencia del periostio, éste modifica su morfología .

La fractura incide poco sobre el valor del registro metafisario, que tras desperiostizar no muestra variaciones significativas a todo lo largo - del experimento. La presencia del periostio determina que el registro alcan- ce su valor mínimo entre el 2º y 6º día postfractura, de forma que los registros del 3º y 5º son estadísticamente diferentes a los del hueso idemne.

A partir de las 24 horas, la diferencia entre el punto II y el IV se hace menos ostensible y vuelve a manifestarse la separación de los valores -

metafisarios y diafisarios proximales de los valores perifracturarios y diafisarios distales cuyas oscilaciones son más marcadas.

Vemos, pues, que tras la fractura, en la primera semana se producen una serie de oscilaciones que desaparecen después. Estas oscilaciones son estadísticamente significativas en sus diferencias entre los puntos máximos y -- los mínimos --GRAFICA XXI-- y más marcadas para el fragmento fracturario distal.

Con el periostio la vuelta de las medias a la normalidad se alcanza -- realmente a los 90 días, aunque por la dispersión de los valores esta normalización sucede antes en torno al 10º día.

Los valores del punto V son totalmente contradictorios si comparamos los registros obtenidos cambiando los electrodos de postura y midiendo directamente a través del foco de fractura, que si obtenemos su magnitud por diferencia entre los puntos II y III, en este caso los valores son en su mayor -- parte negativos, mientras que de la otra forma los registros son en su mayoría positivos.

La interpretación de estos datos es difícil a la luz de nuestros conocimientos y de los hallazgos histológicos relatados más arriba, que nos mostraron que el callo en su evolución es un proceso continuo desde su comienzo, en el que es posible descubrir una serie de fenómenos diferentes que se suceden y se superponen en el tiempo de forma que no encontramos una explicación de las oscilaciones registradas en las manifestaciones histológicas.

La caída de los potenciales derivados por debajo de los valores normales a partir de las 24 horas de evolución y su lenta recuperación, puede quizá explicarse, por un lado, porque la pérdida de continuidad ósea interrumpe de alguna manera el mecanismo que sustenta la aparición de los potenciales; como por otro lado hemos visto que al final del experimento los huesos estudiados no han vuelto a la normalidad, sino que se hallan en plena fase --

de remodelamiento, éste explicaría que los registros se aproximarán a la normalidad sin alcanzarla de forma absoluta.

En relación con los mecanismos de origen del potencial derivado que se interrumpe como consecuencia de la fractura, hemos de considerar en pri - per lugar la lesión de la vascularización medular con rotura de la arteria - nutricia con una repercusión escasa sobre la circulación metafisaria que a lo sumo aparecerá incrementada para permitir la neoformación de una circulación centromedular que pueda nutrir al callo. Podría entenderse así las escasas variaciones en el punto "0", que sólo entre el 3º y 5º día se acercan a él , momentos en que el apote y el drenaje medular están alterados y la prolifera ción celular comienza a alcanzar gran volumen. El acercamiento a "0" de los valores registrados podría interpretarse como predominio del drenaje metafi - sario sobre el aporte o al menos un equilibrio entre ambos flujos.

Al tercer día se cierra la comunicación del foco fracturario con el - exterior y se completa al 5º día en que el coágulo es muy escaso y el callo periosteal bien desarrollado.

Como ya hemos dicho, la vascularización comienza a hacerse manifiesta en la medular y en las partes blandas circundantes a las 48 horas, pero en - las áreas perifracturarias hasta el sexto día no es franco el avance capilar, que llega al trazo de fractura en las tibias entre el 10 y el 14 día, para - establecerse una vascularización completa del callo en las tibias hacia el - 21 día. Ya antes, pero claramente desde esta fecha, predominan los procesos de remodelado óseo.

Estos datos recogidos por nosotros con las técnicas histológicas ordi narias, coinciden con los estudios de la vascularización especializados que - revisamos previamente.

La depresión máxima al 4º día postfractura observada en los registros con periostio, podría explicarse por un flujo masivo centrípeto a través de los vasos periostales, aunque los estudios específicos afirman que la proli -

feración capilar es algo más tardía.

En los registros sin periostio podríamos interpretar las depresiones al tercer día correspondiente al cierre del coágulo más arriba descrito, y la del sexto día al aumento franco de la vascularización a todos los niveles.

La recuperación de unos valores más próximos a la normalidad al décimo día, se podría interpretar quizá como reflejo de la unión de ambos callos medulares.

Todas estas interpretaciones deben someterse a una ulterior correlación entre los fenómenos eléctricos y los vasculares.

Al margen de los factores vasculares hemos de considerar los celulares, pero ya hemos dicho que estos aparecen como un continuo y la forma de poder actuar de alguna manera sobre los fenómenos eléctricos sería a través de las variaciones en el pH local y en la concentración iónica, pero carecemos de datos propios al respecto.

Las influencias que pueda tener el sistema nervioso en este proceso son desconocidas. Por un lado Silbert, Becker, Rose, etc., consideran la presencia del tejido nervioso, de una u otra forma, necesario para el regenerado celular y motor del mismo a través de estos potenciales. De otro lado Navarro, etc., han demostrado que la curación de las fracturas tiene lugar igual en ausencia de la inervación motora. Pensamos que es igualmente un terreno apto para más investigaciones.

Llegamos así a la cuestión inicial — ¿ existe un potencial eléctrico en el hueso que se modifique con la fractura y sea capaz de guiar su desarrollo? —.

Podemos contestar al cabo de este trabajo sólo de forma parcial esta pregunta.



1.- Existe una diferencia de potencial en el hueso intacto parcialmente dependiente de la inervación del miembro y sólo demostrable "in vivo".

2.- Este esquema eléctrico se modifica con la fractura de forma -- que se produce un aumento momentáneo de su valor, con alteración de su -- distribución a ambos lados de la fractura.

3.- A partir de las 24 horas ese valor cae y presenta unas oscilaciones durante la primera semana de evolución del callo a partir de la -- cual vuelve con ligeras oscilaciones lentamente a la normalidad.

Podríamos sugerir entonces que el aumento momentáneo del voltaje inmediatamente después de la fractura junto a los otros factores locales, como es la muerte celular y la hemorragia, son los responsables del desencadenamiento de la respuesta celular.

El descenso posterior de las diferencias de potencial derivadas y su lenta vuelta a la normalidad con la consolidación del callo, sería la contra -- partida de los datos recogidos de la literatura donde la aplicación de una corriente a través del trazo fracturario, acelera el proceso de curación al mantener el estímulo celular en el nivel inicial por encima del valor nor -- malmente registrado.

B I B L I O G R A F I A

## I INTRODUCCION

1. ANQUIN C.E.: Supervivencia después de traumatismos graves. SICOT XI - Congreso Imprim. des Sciences. Bruxelles 1976, pág. 62
2. ARTIGAS V.: Politraumatizados. Soc. Intern. Cir. XXV Congreso. Sociéte Internationale de Chirurgie. Bruxelles, 1973, 35.
3. DOSSA J., CESANO M., KARCENY L.: Les fractures metastatiques des membres. Ann.Chirurgie. 29-2, 103. 1975.
4. DUHAMEL H.L.: Observations sur la reunion des fractures des os. Men.- Acad. Roy. Cs. 54, 97. 1741.
5. EDWARDS P., NILSSON E.: The time of disability following fractures of the shaft of the shaft of the tibia. Acta Orthop. Scand. 40,501. -- 1969.
6. KATZNER M.: Traitement chirurgical des metastases et des fractures metastatiques des os longs. Rev. Chir.Orthop. 60-5, 387. 1974.
7. KUENTSCHER G.: El enclavamiento intramedular. Edit. Científico-médica Madrid 1965.
8. DE MAINEFFE R., BURNY F., KINNAERT P., GEENS M., WAGNER J., BLAIMONT P.: Hierarchie des associations lesionnelles, reanimation et traite - ment des lesions en un temps. SICOT. XI Congreso. Imprim. des -- Sciences, Bruxelles, 50. 1970.
9. MONTICELLI G., DI LEO P.: Ricerche cliniche e bioumorali nel politrau - matizzato della strada. SICOT XI Congreso. Imprim. des Sciences, - Bruxelles, 45. 1970.
10. OLERUD S., KARLSTROEM G.: Tibial fractures treated by A.O. compression osteosynthesis. Acta Orthop. Scand. suppl. 140. 1972.
11. PALACIOS J. de: Polifracturados. VIII Congreso SECOT-SPOT. Estoril - 1971.
12. SILVA J.F.: Survival of multiple injury patients in developing coun - tries. SICOT XI Congreso. Imprim. des Sciences Bruxelles, 84. 1970
13. STRYKER W.S., FUSSELL M.E., WEST H.D.: Comparison of the results of - operative and non operative treatement of diaphyseal fractures of - the femur at the naval hospital San Diego over a 5 years period. -- Journ. Bone Joint. Surg. 52 A, 815. 1970.

## II CELULAS

### A.-OSTEOBLASTO

14. AEGERTER E., KIRKPATRICK J.A.: Orthopedic diseases. Saunders, 1968
15. ASCENZI A., BENEDETTI E.L.: An electron microscopy study of the foetal membranous ossification. *Acta Anat.* 37, 370-385. 1959.
16. BINDERMAN .: Tissue culture of isclated bone cells. *Journ. Cell -- Biol.* 61, 428. 1974.
17. CAMERON D.A.: Fine structure of the osteoblast. *Journ. Biophys. Byochem. Cytol.* 9, 583-593. 1961.
18. CAMERON D.A., PASCHALL H.A., ROBINSON R.A.: The ultraestructure of - bone cells en Frost edit. *Bone Byodinamics*, Little Brown, Boston , 91. 1964.
19. CAMERON D.A., PASCHALL H.A., ROBINSON R.A.: Changes in bone cells af ter P.T.H. administration. *Journ. Cell. Biol.* 33, 1. 1967.
20. CAMERON D.A.: The Ultraestructure of bone. En G.H. Bourne edit. *The biochemistry and physiology of bone*. 191, Academic Press, London - 1972.
21. CARNEIRO J, LEBLOND C.P.: Secretion of collagen by osteoblast. *Exper. Cell. Res.* 18, 291-299. 1959.
22. DAVIS W.L., MATTHEWS J.L., MARTIN J.H., KENNEDY J.W., TALMAGE R.V. : The endosteum as a functional membrane. En Talmage, Owen, Parson - edit. *Calcium regulating hormones*. Excerpta médica, Amsterdam 1975, 275.
23. DOTTY S.B., SCHOFIELD B.H.: Metabolic and structural changes within osteocytes of rat bone. En Talmage y Munson edit. *Calcium, Parathyroid hormone and calcitonin* pág. 353-364. Excerpta médica. Amsterdam, 1972.
24. DUDLEY H.R., SPIRO D.: Fine Structure of bone cells, *Journ. Biophys. Biochem. Cytol.* 11, 627-648. 1961.
25. EHRLICH H.P., ROSS R., BORNSTEIN P.: *Journ. Cell Biol.* 62-2, 390. -- 1974.
26. FELL H.B.: *J. Morphol.* 40, 417, 1925.
27. FITTON-JACKSON S., RANDALL J.T.: Fibrogenesis and the formation of - matrix in developing bone. en CIBA Symposium, *Bone Structure and - metabolism*, 47-63, Churchill, London, 1956.

28. GAILLARD P.J.: Parathyroid gland and bone in vivo. Schweiz. Klin. Wochenschr. 14, 447. 1957.
29. HAM A.W.: Tratado de histología. Interamericana, México, 1970.
30. HELLER-STEINBERG M.: Ground substance, bone salts and cellular activity in bone formation and destruction. Amer. Journ. Anat, 89-3, - 347-376. 1951.
31. JAFFE H.L.: Metabolic, inflammatory and degenerative bone diseases .- Urban und Schwartzberg, Wien, 1972.
32. JOHNSON L.C.: Morphologic analysis in pathology : The kinetics of disease and general biology of bone. En Frost edit. Little Brown , Boston 1964, 543.
33. KAHN A.J., SIMMONS D.J.: Investigation of cell lineage in bone using a chimera of chick and quail embryonic tissue. Nature, 258, 325, - 1975.
34. KNOEFLER E.W.: Die biomechanischen induktionen bei der knochenbruch heilung. Enke, Stuttgart, 1967.
35. LEBLOND C.P., GREULICH R.C.: Autoradiographic studies of bone formation and growth. En Bourne, edit. Biochemistry and physiology of bone. 325. Academic Press, London 1956.
36. LEBLOND C.P., WEINSTOCK M.: Radioautographic studies of bone formation. En Bourne edit. The biochemistry and physiology of bone III, 181, Academic Press, London 1971.
37. LUK, NOPAJAROONSRI, SIMON: Ultrastructure of endosteum. Journ. Ultrastr., Res. 46, 184. 1974.
38. LUK, NAPAJAROONSRI, SIMON: Ultraestructure of cortical bone. Journ.- Ultrastr Res. 46, 174. 1974.
39. MATTHEWS J.L., MARTIN J.H., KENNEDY J.W., COLLINS E.J.: An ultrastructural study of calcium and phosphate deposition and exchange in tissues. CIBA Symposium. 187. Excerpta médica, Amsterdam, 1973
40. OWEN M.: Cell population kinetics of an osteogenic tissue I. Journ . Cell Biol. 19, 19. 1963.
41. OWEN M.: Cellular dynamics of bone. En Bourne edit. The biochemistry and physiology of bone, III, 271, Academic Press, London, 1971.
42. PRITCHARD J.J.: The osteoblast. En Bourne edit., 179, Academic Press 1956.

43. PRITCHARD J.J.: General histology of bone. En Bourne edit. The bio - chemistry and physiology of bone. 1, Academic Press, London 1972 I.
44. PRITCHARD J.J.: The Osteoblast, pág. 21 Bourne edit. The biochemis- try and physiology of bone. 1, Academic Press, London 1972. I.
45. RASMUSSEN H., BORDIER P.: The physiological and cellular basis of me- tabolic bone disease. Williams & Wilkins, Baltimore, 1974.
46. REMAGEN W.: The bone cell System: Form and function. Beitr. Path. 150 1. 1973.
47. ROBINSON R.A.: An electron microscopio study of bone. Journ. Bone -- Joint Surg. 34 A, 389. 1952.
48. ROBINSON R.A., CAMERON D.A.: Electron microscopy of primary spongio- sa of meta physisat distal end of femur in newborn infant. Journ. Bone Joint, Surg. 40 A, 687. 1959.
49. SCOTT B.L.: Thymidine H<sup>3</sup> electron microscope radioautography of os - teogenic cells in the fetal rat. Journ. Cell Biol. 35-1, 115. 1967
50. TALMAGE R.V., MATTHEWS J.L., MARTIN J.H., KENNEDY J.W., DAVIS W.L. , ROYCROFT J.H.: Calcitonin, phosphate and the osteocyte-osteoblast bo- ne cell unit. En Talmage, Owen y Parsons edit. Calcium regula - ting hormones. 284, Excerpta médica, Amsterdam. 1975.
51. WEIDENREICH, F.: en V. Moellendorf edit. Handbuch der mikroskopische anatomie des Menschen II, 391, Springer, 1928.
52. WEINGER J.M., HOLTROP M.E.: An ultrastructural study of bone cells . Calc. tiss. res. 14, 15. 1974.
53. YOUNG R.W.: Specialization of bone cells. En Frost. Edit. Bone Biody- namics. 117. Little Brown, Boston 1964.

## B- OSTEOCITOS:

54. ARNOLD J.S., FROST H.M., BUSS R.C.: The osteocyte as a bone pump. - Clin. Orthop. 78, 47-56. 1971.
55. BAUD C.A.: Morphologie et structure inframicroscopique des osteocytes. Acta Anat. 51, 209-225. 1962.
56. BAUD C.A., MORGENTHALER P.W.: Structure submicroscopique du rebord - lacuno-canaliculaire osseux. Morph. Jb. 104, 476-486. 1963.
57. BAUD C.A., MORGENTHALER P.W.: Etude quantitative des espaces submicroscopiques interfibrillaires dans la substance osseuse. Morph.Jb. 105, 333-342. 1964.
58. BAUD C.A.: Submicroscopic structure and functional aspects of the osteocyte. Clin. Orthop. 56, 227-237. 1968.
59. BELANGER L.F., BELANGER C., SEMBA T.: Technical aproaches leading to the concept of osteocytic osteolysis. Clin. Orthop. 54, 187-197 . 1967.
60. BELANGER L.F.: Osteocytic resorption. En Bourne edit. The biochemistry and physiology of bone. III, 240-271. Academic Press, London - 1971.
61. ENLOW D.H.: Functions of the haversian system: Amer. Journ. Anat. 110, 269, 305. 1962.
62. FRIEND D.S., GILULA N.B.: Variation in tight and gap junctions in mammalian tissues. Journ. Cell Biol. 53, 758-776. 1972.
63. FROST H.M.: Osteocyte death in vivo. Journ. Bone Joint Surg. 42 A, - 138. 1960.
64. FROST H.M.: Micropetrosis. Journ. Bone. Joint Surg. 42A, 144. 1960.
65. FROST H.M.: A new bone affection: Feathering. Journ. Bone Joint. -- Surg. 42A, 447. 1960.
66. FROST H.M.: Dynamics of bone remodeling. En Frost edit. Bone Biodynamics. 315-333. Little Brown, Boston. 1964.
67. JANDE S.S., BELANGER L.F.: The life cycle of the osteocyte. Clin. Orthop. 94, 281-306. 1973.
68. JEE W.S.S.: The influence of redacted local vascularity on the rate of internal reconstruction in adult long bone cortex. En Frost. -- edit. Bone Biodynamics. 259-278, Little Brown, Boston. 1964.

85. WARTIOVAARA J., NORDLING S., LEHTONEN E., SAXEN L.: Cell contacts and induction. Journ. embryol.exp.morph. 31, 667. 1974.
86. WASSERMAN F., YAEGER J.A.: Fine structure of the osteocyte capsule - and of the wall of the lacunae in bone. Z. Zellforsch. Mikrosk.Anat. 67, 636. 1965.



69. JOWSEY J.: Variations in bone mineralization with age and disease. En Frost edit. Bone Biodynamics. 461-481, Little Brown, Boston 1964.
70. LOEWENSTEIN W.R., KANNO Y.: Intercellular communication and tissue - growth I. Journ, Cell Biol. 33, 225-234. 1967.
71. LOEWENSTEIN W.R., PENN R.D.: Intercellular communication and tissue - growth. II. Journ. Cell Biol. 33, 235-242. 1967.
72. Cellular communication through membrane junctions. Arch. Intern. Med. 129, 299-305. 1972.
73. NEUMANN W.F.: The presence of a soluble regulator phase in bone. En Talmage, Owen y Parsons edit. Calcium regulatin hormones, 297-305. Excerpta Médica. Amsterdam 1975.
74. O'LAGUE P., DALEN H., RUBIN H.: Electrical coupling: low resistance junctions between mitotic and interphase fibroblast in tissue culture. Science 170, 465-467. 1970.
75. OSCHMAN J.L., BERRIDGE M.J.: Fed. Proc. 30, 49. 1971.
76. OWEN M.E., TRIFFITT J.T., MELICK R.A.: Albumin in bone. En Hard ti - ssue growth repair and remineralization. Cina symposium. 287-295 . Excerpta médica. Amsterdam. 1973.
77. RECKLINGHAUSEN F.V.: Unteruschungen ueber Rachitis und Osteomalacie. Fischer Jena. 1910.
78. REMAGEN W.: Calciumkinetik und Knochenmorphologie. Thieme 1970. Stutt gart.
79. SCHULZ A., DONATH K., DELLIN G.: Ultrastruktur des Corticalisosteocy ten. Virchows Arch. path. Anat. 364, 347. 1974.
80. SIMIONESCU M., SIMIONESCU N., PALADE G.E.: Segmental differentia -- tions of cell junctions in the vascular endothelium. Journ. Cell - Biol. 67, 863-885. 1975.
81. SOCOLAR S.J., POLITOFF A.L.: Uncoupling cell junctions in a glandu - lar epithelium by depolarizing current. Science 172, 492-494. 1970.
82. TAINAGE R.V.: A study of the effect of parathyroid hormone on bone - remodeling and on calcium homeostasis. Clin. Orthop. 54, 163-175 . 1967.
83. VITALI H.P.: Phasenkontrast und fluoreszenzoptische Untersuchungen zur funktion der Osteocyten. Virch.Arch.path.Anat. 34, 124. 1966.
84. VITALI P.H.: Osteocyte activity. Clin. Orthop. 56, 213. 1968.

## C- OSTEOCLASTOS:

87. BARNICOT N.A., DATTA S.P.: Vitamin A and bone. En Bourne edit. The - biochemistry and physiology of bone. II, 197. Academic Press. 1972. London.
88. BONUCCI E.: The organic-inorganic relationships in bone matrix under going osteoclastic resorption. Calc.tiss.res. 16,13. 1974.
89. CAMERON D.A., ROBINSON R.A.: The presence of crystals in the cyto - plasm of large cells adjacent to the sites of bone absorption. - - Journ. Bone Joint Surg. 40 A, 414. 1958.
90. COOPER R.R., MILGRAM J.W., ROBINSON R.A.: Morphology of the osteon - an electron microscopy study. J. Bone Joint.Surg. 48A, 1239. 1966.
91. DINGLE J.T.: Lysosomal enzymes in skeletal tissues. En Hard tissue - growth repair and remineralization. CIBA symposium, 295. Excerpta medica. Amsterdam 1973.
92. DINGLE J.T.: The role of lisosomal enzymes in skeletal tissues. J. - Bone Joint Surg. 55 B, 87. 1973.
93. GAY C.V., MUELLER W.J.: Carbonic anhidrase and osteoclasts. Science 183, 432. 1973.
94. HAMMARSTROEM L.E., HANKER J.S., TOVERUD S.U : Cellular differences - in acid phosphatase isoenzymes in bone and theets. Clin. Orthop. - 78, 151. 1971.
95. HANCOX N.: The osteoclast. En Bourne edit. 213, Academic Press, 1956 London.
96. HANCOX N.M., BOOTHROYD B.: Motion picture and electron microscope -- studies on the embryonic avian osteoclast. J. biophys. biochem. - cytol. 11, 651. 1961.
97. HANCOX N.M.: The Osteoclast. En Bourne edit. The biochemistry and - physiology of bone I, 45. 1972.
98. HORN V., DVORAK M., SZARKA F.: Neu ansichten ueber die morphologie - und funktion der osteoklastischen zellen. Z. f. Orthop. 113, 12, - 1975.
99. LUCHT U.: Osteoclasts and their relationship to bone as studied by - electron microscopy. Z.Zellforsch. 135, 211. 1972.
100. LUCHT U.: Cytoplasmic vacuoles and bodies in osteoclasts. Z.Zell - -forsch. 135, 229. 1972.

101. LUCHT U.: Centrioles in osteoclasts. Z. Zellforsch. 136, 140. 1972.
102. MC LEAN F.: The parathyroid glands and bone. En Bourne edit. Biochemistry and physiology of bone. 705. Academic Press London 1956.
103. NEUMAN W.F., MULRYAN B.J., MARTIN G.R.: A chemical view of osteoclasts based on studies with yttrium. Clin. Orthop. 17, 124. 1960.
104. NORMAN A.W.: Recent studies on Vitamin D and parathyroid hormone regulation of calcium and phosphorus metabolism. Clin. Orthop. 52, - 249. 1967.
105. POMMER G.: Die Arthritis deformans. Wien 1913.
106. RAISZ L.G., TRUMMEL C.L., MUNDY G.R., LUBEN R.A.: Immunologic factors influencing bone resorption. En Talmage, Owen, Parsons edit. Calcium regulating hormones, 149. Excerpta Medica Amsterdam 1975.
107. TALMAGE R.V., WIMER L.T., TOFT R.J.: Additional evidence in support of Mc Leans feedback mechanism of parathyroid action on bone. -- Clin Orthop 17, 195. 1960.
108. VAES G.: On the mechanisms of bone resorption. J. Cell. Biol. 39, - 676. 1968.
109. VAES G., VREVEN J.: Acid pyrophosphatase, phosphoproteinphosphatase and phosphomonoesterase activities in bone tissue. Israel J. - Med.Sci. 7, 401. 1971.

## 11 MATRIZ OSEA

### A. SUSTANCIA FUNDAMENTAL

110. BELANGER L.F.: Autoradiographic studies of the formation of the organic matrix of cartilage, bone and the tissues of the teeth. En Bone structure and metabolism. Ciba symposium. 75, 1956. Churchill-London.
111. CAMPO R.D., TOURTELLOTE C.D.: The composition of bovine cartilage - and bone. Biochim. Biophys. Acta 141, 614. 1967.
112. CHRISMAN O.D.: The ground substance of connective tissue. En Clin. - Orthop. 36, 184. 1964.
113. DISCHE Z.: (Citado en Herring).
114. DZIEWIATKOWSKI D.C.: The role of sulfated protein-polysaccharides in calcification. Clin. Orthop. 35, 199. 1964.
115. EASTOE J.E.: The organic matrix of bone, en Bourne edit. Biochemistry and physiology of bone, 81, Academic Press, London 1956.
116. ENGFELDT B., STRANDH J.: Microchemical and biophysical studies of -- normal human compact bone tissue. Clin. Orthop. 17, 63. 1960.
117. HERNANDEZ-RICHTER H.J., STRUCK H.: Die Wundheilung. Thieme, Stuttgart 1970.
118. HERRING G.M.: Chemistry of the bone matrix. Clin. Orthop. 36, 169. -- 1964.
119. HERRING G.M.: The organic matrix of bone. En Bourne Edit. The biochemistry and physiology of bone I, London Academic Press, 1972.
120. MEYER K.: The mucopolysaccharides of bone. En Bone structure and metabolism. Ciba symposium, 65. Churchill, London. 1956.
121. SABET T.Y., HAWLEY C.E.: Biological role of heterologous antibodies - against cartilage protein-polysaccharide complex light fraction. - Clin.Orthop. 78, 195. 1971.
122. SILBERT J.E.: Biosynthesis of mucopolysaccharides and protein-polysaccharides. En Ruy Pérez-Tamayo, M.Rojkind: Molecular pathology of -- connective tissues. 323, Dekker. 1973.
123. SILBERT J.E.: Catabolism of mucopolysaccharides and protein-polysaccharides. En Ruy Pérez-Tamayo, M.Rojkind: Molecular pathology of connective tissues. 355, Dekker. 1973.

124. SYLVEN B.: The ground substance of connective tissue and cartilage. En Bourne Edit. Biochemistry and physiology of bone. London Academic press. 1956.
125. WEINSTOCK: Elaboration of enamel and dentin matrix glycoproteins. En Bourne edit. The biochemistry and physiology of bone II, 121, Academic Press. 1972.
126. WOODWARD H.O.: The composition of human cortical bone. Clin.Orthop. 37, 187. 1964.
127. ZERLOTTI E., YAEGER J.A.: Histochemistry and biophysical histology - of the matrices of some mineralized tissues. Clin.Orthop. 51, 223, 1967.

## B- COLAGENO

128. BARNES M.J.: Biochemistry of collagens from mineralized tissues. En: Hard tissues growth, repair and remineralization. Ciba symposium . 247. Excerpta médica. Amsterdam, 1973.
129. EYRE D.R., GLIMCHER M.J.: The lability of aldimine crosslinks on dis solution on chicken bone collagen by proteins denaturants. En: -- Kuhlencordt, Kruse edit. Calcium metabolism bone, and metabolic bo ne diseases. 176. Springer. 1975.
130. FERNANDEZ MADRID F.J.: Journ. Cell Biol. 33, 27. 1967.
131. GALLOP P.M.: Nature, 209, 73 . 1966.
132. GLIMCHER M.J., KRANE S.M.: The organization and structure of bone. - En Gould y Ramachandran edit. A treatise on collagen II, Academic Press, London. 1968.
133. GRANT M.E., PROCKOP .: Biosynth sis of collagen. N.Engl.J.Med. 286, 194, 242, 291. 1972.
134. IGARASHI M., HAYASHI Y., MATSUURA M., YOSHUNO S.: The role of lysyl residue in collagen structure with calcification and aging. En Ku hlencordt, Kruse, edit. Calcium metabolism, bone and metabolic bo ne diseases. 184, Springer, Berlín. 1975.
135. KUEHN K.: Kollagenstoffwechsel. Arzneim. Forsch. 24, 225. 1974.
136. MECHANIC G.L.: Collagen structure and calcification. En Kuhlencordt, Kruse edit. Calcium metabolism, bone and metabolic bone diseases , 157. Springer 1975. Berlín.
137. MILLS B.G., BAVETTA L.A.: Bone collagen dynamics. Clin.Oothop. 57, - 267. 1968.
138. PEREZ-TAMAYO R.: Collagen degradation and resorption. En Molecular -- patholofy of connective tissues. 229, Dekker, New York, 1973.
139. PETRUSKA J.A., HODGE A.J.: A subunit model for the tropocollagen ma cromolecule. En Proc. Nat. Acad.Sci. 51, 871. 1964.
140. PIEZ K.A.: Soluble collagen and denaturation components. En Ramachan dran edit. Treatise on collagen I, 207, Academic Press, London, -- 1967.
141. PRIEST R.E.: Biosynthesis of collagen and elastin. En Molecular pa - thology of connective tissues. Pérez-Tamayo y Rojkind edit. Dekker, 105, New York, 1973.

142. RAMACHANDRAN G.N.: Structure of collagen at the molecular level. En Ramachandran edit. Treatise on collagen I, 103, London Academic - press, 1967.
143. RAUTENBERG J.: The c-terminal non-helical portion of the collagen - molecule. Clin.Orthop. 97, 196. 1973.
144. ROJKIND M.: Molecular structure of the fibrous components of the - connective tissue. En Pérez-Tamayo y Rojkind edit. Molecular pa -- thology of connective tissues, 1, Dekker, New York, 1973.
145. ROUILLER C.: Collagen fibers of connective tissue. En Bourne edit.- Biochemistry and physiology of bone. 107, Academic Press. London 1956.
146. SCHOFIELD J.D., PROCKOP D.J.: Precollagen: A precursor form of co - llagen, Clin.Orthop. 97,175. 1973.
147. SPEAKMAN P.T.: Proposed mechanism for the biological assembly of co llagen triple helix. Nature 229, 241. 1971.

## C- MINERAL Y CALCIFICACION

148. ANDERSON H.C.: Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. J.Cell Biol. 41, 59. 1969.
149. ARMSTRONG W.D., SINGER L.: In vitro uptake and exchange of bone citrate. En bone structure and metabolism. Ciba symposium, 103, -- Churchill, London 1956.
150. ASCENZI A., BONUCCI E.: Further investigations on the function of - the osteonic lamellae according to collagen and crystallite orientation. En Kuhlencordt Kruse. Calcium metabolism, bone and metabolic bone diseases. 172, Springer 1975.
151. BACHRA B.N.: Some molecular aspects of tissue calcification. Clin.- Orthop. 51, 199. 1967.
152. BACHRA B.N.: Calcification of collagenous material in vitro as model system for biological calcification. En Khlencordt, Kruse edit. -- Calcium metabolism, bone and metabolic bone diseases. 164. Springer, 1975.
153. BAUD C.A., POU EZAT J.A.: Morphological and crystallographic analysis of bone mineral. En Kuhlencordt, Kruse edit. Calcium metabolism, - bone and metabolic bone diseases, 3. Springer, 1975.
- 153 b. BAUD C.A., POU EZAT J.A., BADONNEL : Electron microscope and electron diffraction study of experimental cutaneous calcinosis. Clin.Orthop 69, 55. 1970.
154. BEALE R.J., SCHUBERT M.: Speeding the precipitation of calcium phosphate at low values of its ion product by a particular protein-polysaccharide of cartilage. Clin. Orthop. 80, 202. 1971.
155. BILTZ R.M., PELLEGRINO E.D.: Journ. Bone Joint Surg. 51 A, 456. 1969.
156. BONUCCI E., MATRAJT H., TUN-CHOT S., HIOCO D.: Bone structure in osteomalacia with special reference to ultrastructure. J. Bone Joint Surg. 51 B, 511. 1969.
157. BONUCCI E.: The locus of initial calcification in cartilage and bone Clin. Orthop. 78, 108. 1971.
158. BONUCCI E., PERUGIA L., SANDUN R.: Calcificación del músculo estriado inducidas experimentalmente. Rev. Ortop.Traum. 19 IB, 695. 1975
159. BORLE A.B.: Membrane transfer of calcium. Clin.Orthop. 52, 267. 1967
160. BORLE A.B.: Regulation of the mitochondrial control of cellular calcium homeostasis. En Talmage, Owen, Parsons edit. Calcium regula-



ting hormones, 217. Excerpta médica. Amsterdam 1975.

161. BOURNE G.H.: Phosphatase and bone. En Bourne edit. Biochemistry and physiology of bone, 251. Academic Press, London 1956.
162. BOURNE G.H.: Phosphatase and calcification. En Bourne edit. The biochemistry and physiology of bone II, 79, Academic press. 1972.
163. BRONNER F.: Quantitative aspects of calcium metabolism and homeostasis. En Kuglencordt y Kruse edit. Calcium metabolism, bone and diseases, 14, Springer. 1975.
164. CARLSTRÖM D, ENGSTRÖM, A.: Ultrastructure and distribution of mineral salts in bone tissue. En Bourne edit. Biochemistry and physiology of bone. 149. Academic press. 1956.
165. DALLAMAGNE M.J., FABRY C.: Structure of bone salts. En Bone structure and metabolism. Ciba symposium. 14, Churchill. 1956.
166. DALLEMAGNE M.J.
167. DIXON T.F., PERKINS H.R.: The chemistry of calcification. En Bourne edit. Biochemistry and physiology of bone. 287, 309. Academic Press. 1956.
168. EANES E.D., TERMINE J.D., POSNER A.S.: Amorphous calcium phosphate in skeletal tissues. Clin.Orthop. 53, 223. 1967.
169. ENGSTRÖM A.:Structure of bone from the anatomical to the molecular level. En Bone Structure and metabolism. 3, Churchill, London 1956.
170. ENGSTRÖM A.:The structure of bone. Clin. Orthop. 17, 34. 1960.
171. ENGSTRÖM A.:Aspects of the molecular structure of bone. En Bourne -- edit. Biochemistry and physiology of bone I. Academic Press. 1971.
172. FLEISCH H.: Role of nucleation and inhibition in calcification. Clin. Orthop. 32, 170. 1964.
173. FLEISCH H., RUSSELL R.G.G., BISAZ S., BONJOUR J.P.: The affects of -- pyrophosphate and diphosphonates on calcium metabolism. En Hard tissues growth, repair and remineralization. 348, Excerpta Medica, - 1973.
174. FRANCIS M.D., BRINER W.W., GRAY J.A.: Chemical agents in the control of calcification processes in biological systems. En Har tissue -- growth, repair and remineralization. 57, Excerpta Medica. 1973.

175. GERLACH U., HÖHLINGER J.H., THEMANN H.: Metabolism and structure of connective tissue during extraosseous calcification. Clin. Orthop. 69, 118. 1970.
176. HALL B.K.: Calcification of the cartilage formed on avian membrane - bones. Clin.Orthop. 78, 182. 1971.
177. HOWELL D.S.: Review article the mechanisme of calcification. J.Bone Joint Surg. 53 A, 250. 1971.
178. HOWELL D.S., PITA J.C., KUETTNER K.: Evidence for a role of lysozyme in enchondral calcification. En Kuhlencordt y Kruse. Calcium metabolism, bone and metabolic bone diseases. 189, Springer. 1975.
179. KASHIWA H.K., MUKAI C.D.: Lipid-calcium-phosphate spherules in chondrocytes of developing long bones. Clin. Orthop. 78, 223. 1971.
180. KNESE K.H.: Knochenstruktur als verbundbau. Thieme. 1958. Stuttgart.
181. IRVING J.T.: Histochemical changes in the early stages of calcification. Clin. Orthop. 17, 92. 1960.
182. IRVING J.T., WUTHIER R.E.: Histochemistry and biochemistry of calcification. Clin. Orthop. 56, 237. 1968.
183. IRVING J.T.: Theories of mineralization of bone. Clin.Orthop. 97,225, 1973.
184. JAHN T.L.: A possible mechanism for the effect of electrical potentials on apatite formation in bone. Clin.Orthop. 56, 261. 1968.
185. LEONARD F., WADE C.W.R., HEGHYELI A.F.: Mechanism of calcification . Clin. Orthop. 78, 168. 1971.
186. MARTIN J.H., MATTHEWS J.L.: Mitochondrial granules in Chondrocytes.- Cal. tiss. res. 3, 184. 1969.
187. MILLS B.G., HOLST P., HAROUTINIAN A.M., BAVETTA L.A.: Bone cells response to serum calcium altering drugs. Clin. Orthop. 78, 56. 1971.
188. MOLNAR Z.: Additional observations on bone crystal dimensions. Clin. Orthop. 17, 38. 1960.
189. NEUMAN W.F.: Blood-bone exchange. En Frost edit. Bone Byodinamics. - 393. Little Brown, Boston 1964.
190. OSTROWSKI K., DZIEZIG-GOCLAWSKA A., STACHOWICZ W., MICHALIK J.: Application of electron spin resonance in research on mineralized tissues. Clin.Orthop. 97, 213. 1973.

191. PANFILI E., SANDRI G., SOTTOCASA G.L.: Some properties of an isolated glycoprotein possibly related to calcium transport in mitochondria. Acta vitamin.enzymol. 28, 323. 1974.
192. POSNER A.S., BLUMENTHAL N.C., BOSKEY A.L., TANNENBAUM: The formation of bone mineral. En Kuhlencordt y Kruse edit. Calcium metabolism, - bone and metabolic bone diseases. 190. Springer 1975.
193. POSNER A.S., BEEBE R.A.: The surface chemistry of bone mineral and related calcium phosphates. Seminars in arthritis and rheumatism. 4, - 267. 1975.
194. REYNOLDS J.J.: Bone turnover, vitamin D and plasma calcium homeostasis. En Talmage, Owen y Parsons edit. Calcium regulating hormones - 254. Excerpta Medica. 1975.
195. RICHELLE L.J.: One possible solution to the problem of the biochemistry of bone mineral. Clin.Orthop. 33, 211. 1964.
196. ROBINSON R.A., ELLIOT S.R.: The water content of bone I. J.Bone Joint Surg. 39 A, 167. 1957.
197. ROBINSON R.A.: Crystal-collagen-water relationships in bone matrix. -- Clin. Orthop. 17, 69. 1960.
198. ROBINSON R.A.: Observations regarding compartments for tracer calcium in the body. En Frost. edit. Bone Biodynamics. 423, Little -- Brown. Boston 1964.
199. ROBLES MARIN D., SMITH AGREDA V., FERNANDEZ IZQUIERDO M., NIETO SARRIENTO J.: Origen de la calcificación de la sustancia fundamental y estudio vascular. Rev.Orthop.Traum. 18 IB, 517. 1974.
200. ROWLAND R.E.: Exchangeable bone calcium. Clin. Orthop. 49, 233. 1966.
201. RUSSELL R.G., FLEISH H.: Inorganic pyrophosphate and pyrophosphatases in calcification and calcium homeostasis. Clin.Orthop. 69, 101. 1970
202. Salomon C.D., RAY R.D.: J.Bone Joint.Surg. 48 A, 1575. 1966.
203. SEIFERT G.: Morphologic and biochemical aspects of experimental extraosseous calcification. Clin.Orthop. 69, 146. 1970.
204. SEYLE H.: The present status of calciophylaxis and calcergy. Clin. Orthop. 69, 28. 1970.
205. SOBEL A.E., BURGER M., NOBEL S.: Mechanisms of nuclei formation in mineralizing tissues. Clin. Orthop. 17, 103. 1960.
206. SUTFIN L.V., HOLTROP M.E., OGILVIE R.E.: Microanalysis of individual

mitochondrial granules with diameters less than 1000 angstroms. -  
Science 174, 947. 1971.

207. TERMINE J.D., EANES E.D.: Calcium phosphate deposition from balanced salt solutions. Calc. tiss. res. 15, 81. 1974.
208. URIST M.R., DOWELL T.A.: The newly deposited mineral in cartilage - and bone matrix. Clin. Orthop. 50, 291. 1976.
209. URIST M.R., MEYER P., MERICKEL K.S.: Calcium transport and calcification studies by microperfusion. Clin. Orthop. 78, 173. 1971.
210. VOGEL J.J., ENNEVER J.: The role of a lipoprotein in the intracellular hydroxy apatite formation. Clin.Orthop. 78, 218. 1971.

## CALLO DE FRACTURA

- 211. ALLGÖWER M.: Die bildung des granulationsgewebes - en XV Congreso Soc. Intern. Chir. 1953 Lisboa.
- 211 A ALLGÖWER M.: Chirurgie Springer, 1973.
- 212. ABDIN M., FRIEDENSTEIN A.Y.: Electron microscopic study of bone induction. Clin. Orthop. 82,182. 1972.
- 213. AKESON W.H., WOO S.L., RUTHERFORD L., COUTTS R.D., GONSALVEZ M., AMIEL D.: The effects of rigidity of internal fixation plates on long bone - remodeling. Acta Orthp. Scand. 47,241. 1976.
- 214. ANDERSON L.D.: Compression plate fixation and the effect if different types of internal fixation on fracture healing. J. Bone Joint. Surg. 47 A, 191. 1965.
- 215. ANDERSON C.E., PARKER J.: Invasion and resorption in enchondral ossification. J. Bone Joint Surg. 48 A,899, 1966.
- 216. ASADA T.: Uber die histogenese und die ossifikation des callus. Arch. - Klin. Chir. 147, 199. 1928.
- 217. AUSTEEN : The acute inflammatory response. Hollander edit. Arthritis - Lea Febiger. 1973.
- 218. AXHAUSEN W.: The osteogenic phase of regeneration of bone. J. Bone - - Joint Surg. 38A, 593. 1956.
- 219. BASSETT C.A.L., CREIGHTON D.K., STINCHFIELD F.E.: Contribution of endosteum, cortex and soft tissues to osteogenesis. Surg. Gyn. Osbt. - 145, 152. 1961.
- 220. BASSETT C.A.L.: Current concepts of bone formation. J. Bone Joint.Surg. 44A, 1217. 1962.
- 221. BASSETT C.A.L.: Enviromental factors in the regulation of cell physiology. In skeletal issues. Frost edit. Bone Byodinamics. 189. 1964 . Brown.
- 222. BAUER C.: Experimentelle calluserzeugung durch replantation der callusbildenden Gewebe. Arch.Klin.Chir. 156, 251. 1929.
- 223. BAUER G.C., CARLSSON A.: Metabolism of bone salt investigated by simultaneous administration of <sup>45</sup>Ca and <sup>32</sup>P to rats. J.Bone Joint.Surg. 37 B, 658. 1955.

224. BELJAN J.R., HELLEWELL A.B., GOLDMAN M.: The effect of calcium deficiency on healing of experimental fractures in the avian tarsus as determined by the fracture repair ratio. Clin.Orthop. 78, 277. 1971.
225. BENTLEY G., GREER R.B.: The fate of chondrocytes in enchondral ossification in the rabbit. J. Bone Joint. Surg. 52B, 571. 1970.
226. BERESFORD W.: Healing in the experimentally fractured os priapi of the rat. Acta. Orthop. Scan. 41, 129. 1970.
227. BERGMANN E.: Zu der frage der endostalen Callusbildung. Arch.Klin. - Chir. 129, 490. 1924.
228. BIER A.: Über Knochenregeneration, über Pseudoarthrosen und über Knochentransplantate. Arch.Klin.Chir. 127, 1. 1923.
229. BLAISDELL F.E.: The osteogenic function of the periosteum. Arch.Surg. 11, 933. 1925.
230. BOHR H., SORESENSEN A.H.: Study of fracture healing by means of radioactive tracers. J.Bone Joint.Surg. 32A, 507. 1950.
231. BOHR H., RAUN H.V., WERNER H.: The osteogenic effect of bone transplants in rabbits. J. Bone Joint.Surg. 50B, 866. 1968.
232. BONFIGLIO M.: Repair of bone, transplants, fractures. J.Bone Joint.Surg. 40A, 446. 1958.
233. BOYNE P.J.: Autogenous cancellous bone and marrow transplants. Clin. - Orthop. 73, 199. 1971.
234. BRIGHTON C.T., HEPPENSTALL R.B.: Oxygen tension in zones of the epiphyseal plate, the metaphysis and diaphysis. J. Bone Joint. Surg. - 53A, 719. 1971.
235. BRIGHTON C.T., KREBS A.G.: Oxygen tension of healing fractures in the rabbit. J.Bone Joint.Surg., 54A, 323. 1972.
236. BRIGHTON C.T., HUNT : Mitochondrial calcium and its role in calcification. Clin.Orthop., 100, 406. 1974.
237. BROOKES M.: The blood supply of bones. Butterworths, London, 1971.
238. BURGER M., SHERMAN B.S., SOBEL A.E.: Observations of the influence of chondroitin sulfate on the rate of bone repair. J.Bone Joint.Surg. 44A, 675. 1962.
239. BÜRING K., URIST M.R.: Transfilter bone induction, Clin.Orthop., 51, - 235. 1968.

240. BÜSH, E.: Ein beitrage zur frage der knochenregeneration. Arch.Klin. - Chir. 146, 586. 1927.
241. CAPO C., BOUGRAND P., BENOLIEL A.M.: Phagocytosis. J.Theor.biol. 47, 177. 1974.
242. CARTIER P.H., BERNARD B., LAGRANGE J.: Studies on the repair of fractures using P<sup>32</sup>. En CIBA Bone Structure and metabolism, 148. Churchill, 1956.
243. CHALMERS J., GRAY D.H., RUSH J.: Observations on the induction of bone in soft tissues. J.Bone Joint.Surg. 57B, 26. 1975.
244. CLARK H.B., HAYES P.A.: A study of the comparative effects of rigid - and semirigid fixation on the healing of fractures of the mandible in dogs. J. Bone Joint.Surg. 45A, 731. 1963.
245. COHEN J., LACROIX P.: Bone and cartilage formation by periosteum. J. Bone Joint.Surg. 37A, 717. 1955.
246. COUTELIER L.: Recherches sur la guerison des fractures. Arscia. 1969, Bruxelles.
247. COUTTS R.D., HARRIS W.H., WEINBERG E.H.: Compression plating. Acta Orthop. Scand. 44, 256. 1973.
248. DANCKWARDT-LILLIESTRÖM G.: Reaming of the medullary cavity and its -- effect on dyaphyseal bone. Acta Orthop.Scand. Suppl. 128. 1969.
249. DANCKWARDT-LILLIESTRÖM G., LORENZI G.L., OLERUD S.: Intramedullary - nailing after reaming. Acta Orthop.Scand.Suppl. 134. 1970.
250. DANCKWARDT-LILLIESTRÖM G., LORENZI G.L., OLERUD S.: Intracortical circulation after intramedullary reaming with reduction of pressure in the medulary cavity. J.Bone Joint.Surg. 52A, 1390. 1970.
251. DANIS A.: Theorie et pratique de l'osteosynthese. Masson 1949
- 251 B DANIS A.: Le cal de fracture nait de la moelle osseuse. Acta Orthop. Belg. 39, 696. 1973.
252. DEBRUNNER H., FROSCHE L.: Experimentelle und klinische untersuchungen zur Pseudoarthrosenfrage. Arch. Orthop.Unfall.Chir. 24, 261. 1926.
253. DELEU J., TRUETA J.: Vascularization of bone grafts in the anterior - chamber of the eye. J. Bone Joint.Surg. 47B, 319. 1965.
254. DEUTSCH A., GUDMUNDSON C.: Nucleic acids in regenerating rabbit bone. Clin. Orthop. 69, 239. 1970.
255. DEUTSCH A., GUDMUNDSON C.: Ribonucleic acids in healing human bone.Clin. Orthop. 80, 155. 1971.

256. DHEM A.: Le forage des canaux de havers. Rev. Chir. Orthop. 51, 583, 1965.
257. DIEHL K., MITTELMEIR H.: Spongiosierung bei der Plattenosteosynthese. Z. Orthop. 112, 236. 1974.
258. DIETERICH H.: Die histogenese des callus. Arch.Klin.Chir, 141, 27. 1926
259. DUBUC F.L., URIST M.R.: The accessibility of the bone induction principle in surface decalcified bone implants. Clin. Orthop. 55, 217. -- 1967.
260. DURIEZ J.: Les processus fondamentaux de l'osteogenese de reparation. Rev. Chir. Orthop. 58, suppl. I, 11. 1972.
261. DUTHIE R.B., BARKER A.N.: An autoradiographic study of mucopolysaccharide and phosphate complexes in bone growth and repair. J.Bone Joint Surg. 37B, 304. 1955.
262. DUTHIE R.B., BARKER A.N.: The histochemistry of the preosseous stage of bone repair. J. Bone Joint.Surg. 37B, 691. 1955.
263. EGGERS G.W.N.: Internal contact splint. J.Bone Joint.Surg. 30A, 40, - 1948.
264. EGGERS G.W.N., SHINDLER T.O., POMERAT C.M.: The influence of the contact compression factor on osteogenesis in surgical fractures. J. - Bone Joint.Surg. 31A, 693. 1949.
265. ELVES M.W., PRATT L.M.: The pattern of new bone function in isografts of bone. Acta Orthop. Scand. 46, 549. 1976.
266. ENNEKING W.F., BURCHARDT H., PUHL J.J., PIETROWSKI G.: Physical and biological aspects of repair in dog cortical bone trasplants. J. - Bone Joint.Surg. 57A, 237. 1975.
267. FELL H.B.: Some factors in the regulation of cell physiology in skeletal tissues. en Frost. edit. Bone Byodinamics, 189, Little Brown, 1964.
268. Forum sur l'osteogenese. Rev. Chir. Orthop. 52, 711. 1966.
269. FRIEDENBERG : Compression forces in fracture healing. Surg. Gyn. -- Obst. 94, 740. 1952.
270. FRIEDENSTEIN A.J.: Determined and inductible osteogenic precursor -- cells. En Hard tissue growth repair and remineralization. 182, Excerpta Médica, 1973.



271. GEISER M., TRUETA J.: Muscle action, bone rarefaction and bone formation J. Bone Joint. Surg. 40B. 1958.
272. GEIST M., SPENCER G.E., CHASE S.W., HERNDON C.H.: Effects of continuous suction of fracture site on fracture healing in dogs. Surg. Gyn. - - Obst. 118, 972. 1964.
273. GIRGIS F.G., PRITCHARD J.: Experimental production of cartilage during the repair of fractures of the skull vault in rats. J. Bone Joint. - Surg. 40B, 274. 1958.
274. GUDMUNSON C., SEMB L.A.: Enzyme studies of fractures with normal and - delayed union. Acta Orthop. Scand. 42, 18. 1971.
275. GUDMUNSON C., SEMB L.A.: Isoenzymes of lactic dehydrogenase and esterases in regenerating bone. Acta Orthop. Scand. 42, 297. 1971.
276. GUDMUNSON C., LIDGEN L.: Does dyphenylhydantoin accelerate healing of fractures in mice. Acta Orthop. Scand. 44, 256. 1973.
277. HAM A.W.: A histological study of the early phases of bone repair. J. Bone Joint. Surg. XII, 827. 1930.
278. HAM A.W., HARRIS W.R.: Repair and transplantation of bone. En Bourne Edit. The biochemistry and physiology of bone III, 338, Academic Press, - 1972.
279. HEIKKINEN E.T., VIHERSAARI T., PENTTINEN R.: Effect of previous exercise on fracture healing. Acta Orthop. Scand. 45, 481. 1974.
280. HEIPLE K.G., HERNDON C.H.: The pathologic physiology of nonunion. Clin. Orthop. 43, 11. 1966.
281. HEIPLE K.G., HERNDON C.H., CHASE S.W., WATTLEWORTH A.: Osteogenic induction by osteosarcoma and normal bone in mice. J. Bone Joint. Surg. 50A, 311. 1968.
282. HELLEWELL A.B., BELJEN J.R., GOLDMAN M.: Effect of chronic administration of a glucocorticoid on the rate of healing of experimental osseous defects. Clin. Orthop. 100, 349. 1974.
283. HEROLD H.Z., HURVITZ A., TEDNOR A.: The effect of growth hormone on the healing of experimental bone defects. Acta Orthop. Scand. 42, 377, - 1971.
284. HERZOG K.T.: Zum begriff der stabilen osteosynthese. Arch. Orthop. Unfall Chir. 55, 63. 1963.
285. HOFFMAN V.: Die autoplastischen knochentransplantationen vom standpunkt der Biologie und architektonik. Arch. Klin. Chir. 129, 750. 1924.

286. HULTH A., OLERUD S.: Studies on amputation stumps in rabbits. J. Bone - Joint. Surg. 44B, 431. 1962.
287. HULTH A., OLERUD S.: Early fracture callus in normal and cortisone treated rats. Acta Orthop. Scand. 34, 23. 1964.
288. HURLEY L.A., STINCHFIELD F.E., BASSETT C.A.L., LYON F.H.: The role of - soft tissues in osteogenesis. An experimental study of canine spine - fusions. J. Bone Joint.Surg. 41A, 1243. 1959.
289. Jessen H.: Über die bedeutung des Periosts bei der entstehung und behan-  
dlung der pseudoarthrose. Arch. Klin.Chir. 137, 285. 1925.
290. JOWSEY J.: Studies on haversian systems in man and some animals. J. Anat. 100, 857. 1960.
291. JUDET R. et J.: L'osteogenese et les retards de consolidation et les pseu-  
doarthroses des os longs. 8<sup>e</sup> Congreso S.I.C.O.T., New York, 1960.
292. KATZENSTEIN M.: Die wechselseitigen störungen der knochenhaut und den -  
knockemarks im knochenaufbau. Arch.Klin.Chir. 145, 461. 1927.
293. KAHN A., SIMMONS D.: Investigation of cell lineage in bone using a chi -  
maera of chick and quail embryonic. Tissue. Nature, 258, 325. 1975.
294. KAWABATA M., RAY R.D.: Experimental study of peripheral circulation and  
bone growth. III, Clin. Orthop. 54, 175. 1967.
295. KELLEY R.O.: Ultraestructure of chondrogenesis in man. J. Embryol. exp.  
morph. 33, 387. 1975.
296. KEMBER N.F.: Cell division in enchondral ossification. J. Bone Joint Surg.  
42 B, 824. 1960.
297. KEITH A.: Bone growth and bone repair. Brit. J. Surg. V. 658. VI. 19, -  
160. 1918.
298. KEWABAMANI, LAXNAR S., SETH P.K.: The role of petal technique in activa-  
tion of osteogenesis. Acta Orthop. Scand.44, 611. 1973.
299. KIVISAARI J., NIINIKOSKI J.: Tissue oxigen and carbon dioxide tensions -  
in healing rabbits tibias. Acta Orthop. Scand. 46, 269. 1975.
300. MC KIBBIN B., RAY R.D.: Experimental study of peripheral circulation and  
bone growth II. Clin. Orthop. 53, 175. 1967.
301. KOCH H.: Über knochenregeneration. Arch. Klin. Chir. 135, 48. 1925.
302. KOCH H.: Über die bedeutung der knochenhaut bei der knochebrucheinrich-  
tung. Arch. Klin. Chir. 146, 425. 1927.
303. KÖNIG F.: Über abbau am gebrochenen knochen sein wesen und seine bedeu-  
tung. Arch. Klin. Chir. 146, 586. 1927.

304. KOSKINEN E.: The influence of hormonal treatment on experimental - fractures. Acta Orthop. Scand. suppl. 80. 1965.
305. KROMPECHER S.: Über den primär angiogenen Kallus: Morph. Jb. 102, - 337. 1962.
306. KROMPECHER S.: Über den Spongiosakallus. Z. Orthop. 112, 1196. 1974.
307. KRUSE R.L., KELLY P.J.: Acceleration of fracture healing distal to a venous tourniquet. J. Bone Joint Surg. 56 A, 730. 1974.
308. KUHLMAN R.E.: A microchemical study of the developing epiphyseal plate. J. Bone Joint. Surg. 42A, 457. 1960.
- 308 B KUHLMAN R.E., MC NAMEE M.J.: The biochemical importance of the hypertrophic cartilage cell area in enchondral bone formation. J. Bone Joint. Surg. 52A, 1025. 1970.
309. KUHLMAN R.E., RAINEY R., O'NEIL R.: Biochemical investigations of - deer antler growth. II. J. Bone Joint. Surg. 45A, 345. 1963.
310. KÜNTSCHER G.: Das Kallus problem. Enke. 1970. Stuttgart.
311. LACROIX P.: The growth of the bone marrow. J. Bone Joint Surg. 31A, 776. 1949.
312. LACROIX P.: Sur la réparation des fractures des mécanismes locaux. XV, Congreso Soc. Intern. Chir., Lisboa 1953.
313. LAURNEN E.L., KELLY P.J.: Blood flow, oxygen consumption carbon dioxide production and blood calcium and pH changes in tibial fractures in the dog. J. Bone Joint Surg. 51A, 298. 1969.
314. LEMAIRE R.G.: Calcium metabolism in fracture healing. An experimental kinetic study using  $\text{Ca}^{45}$  in rats. J. Bone Joint Surg. 48A, 1145. - 1966.
315. LERICHE R., POLICARD A.: Les problèmes de la physiologie normale et pathologique de l'os. Masson 1926. Paris.
316. LEXER R.: Die freien Transplantationen II, Enke, 1924. Stuttgart.
317. LINDHOLM T.S.: Biochemical studies of tibial fracture callus in growing osteopenic rats. Acta Chir. Scand. suppl. 449. 1975.
318. LINDHOLM T.S., LINDHOLM R., TOKKANEN S., LINO R.: Effect of forced - interfragmental movements on the healing of tibial fractures. Acta Orthop. Scand., 40, 721. 1969.

- 318 B LINDHOLM T.S., LINDHOLM R., LIUKKO : Fracture healing and mast cells I y II. Acta Orthop. Scand. 38, 115. 1967.
319. LINDHOLM T.S., LINDHOLM R.: Mast cells in endosteal and periosteal repair. Acta Orthop. Scand. 41, 129. 1970.
320. LINDHOLM T.S., LINDHOLM R., LIUKKO P., PAASINÄKI, ISOKANKA, ROSSI, - AUTIO, TOMIN : The mast cell as a component of callus in healing -- fractures. J. Bone Joint. Surg. 51B, 148. 1969.
321. LUBARSCH O.: Inflamación en Aschoff Tratado de anatomía patológica I, 571. Labor, 1934 Madrid.
322. LUTTI A.M.: Heteroimplants of epiphyseal cartilage in fracture gaps. J. Bone Joint. Surg. 56B, 186. 1974.
323. MAKLEY J.T., HEIPLE K.G., CHASE S.M., HERNDON C.H.: The effect of reduced barometric pressure on fracture healing in rats. J. Bone - Joint. Surg. 49A, 903. 1967.
324. MANABE S., SHIMA I., YAMANICHI : Cytokinetic analysis of osteogenic cells in the healing process after fracture. Acta Orthop. Scand.-46, 161. 1975.
325. MARTIN B.: Über experimentelle pseudoarthrosen bildung und die bedeutung von Periost und Mark. Arch. Klin. Chir. 114, 664. 1920.
326. MARTIN B.: Zur knochenregeneration aus dem Periost. Arch. Klin. Chir. 120, 744. 1922.
327. MARTIN B.: Die sympathischen knochenerkrankung. Arch. Klin. Chir. 129, 45. 1924.
328. MARTIN B.: Über die osteogenetische fähigkeit des periostes. Arch. - Klin. Chir. 144, 489. 1927.
329. MAURER P., EVRARD J., HAUTHE V., MAZABRAUD A.: Contribution a l'etude de la consolidation osseuse premier resultats. Etude des reactions vasculaires. Rev. Chir. Orthop. 49, 689. 1963.
330. MAURER P., ZUCMAN J., LAVALLE P.: Role de la vascularization perifracturaire et centromedullaire dans l'osteogenese eeparatrice . Rev. Chir. Orthop. 51, 229. 1965.
331. MELCHER A.H., DREYER C.J.: Protection of the blood cloth in healing - circumscribed bone defects. J. Bone Joint. Surg. 44B, 424. 1962.
332. MELCHER A.H., IRVING J.I.: The healing mechanism in artificially - created circumscribed defects in the femora of albino rats, J. Bone Joint. Surg. 44B, 928. 1962.

333. MINDELL E.R., RODBON S., KWASMAN B.G.: Chondrogenesis in bone repair. A study of the healing fracture callus in the rat. Clin. Orthop. 79, 187. 1971.
334. MITTELSTILLER S.: Beiträge zur Kenntnis der mikroskopischen Befunde bei Pseudoarthrosen. Arch. Klin. Chir. 122, 939. 1923.
335. MONTICELLI G.: Il callo osseo normale e patologico. Fisiopatologia. - 40 Congreso de la Soc. Ital. Ortop. Roma 1955.
336. MUNHEIM G.: Assessment of fracture healing in men by  $Sr^{87}$  scintigraphy. Acta Orthop. Scand. 44, 621. 1973.
337. MÜLLER W.: Die Normale und pathologische Physiologie des Knochens. - Barth, 1924 Leipzig.
338. MÜLLER M.E.: A propos de la guérison "per primam" des fractures. Rev. Chir. Orthop. 50, 697. 1964.
339. NARANG R., LLOYD W., WELLS H.: Grafts of decalcified allogenic bone - matrix promote the healing of fibula fracture gaps in rats. Clin. - Orthop. 80, 174. 1971.
340. NAVARRO QUILIS R., LLOYD W., WELLS H.: Healing in denervated bones. Acta Orthop. Scand. 45, 820. 1974.
341. NGUYEN W., JOWSEY J.: A Study of bone formation in dogs of different metabolic states. Acta Orthop. Scand. 40, 708. 1969.
342. NIINIKOSKI J., HUNT T.K., DUMPHY J.E.: Oxygen supply in healing tissue. Amer. J. Surg. 123, 247. 1972.
343. NIINIKOSKI J., HUNT T.K.: Oxygen tension in healing bone. Surg. Gyn. Obst. 134, 746. 1972.
344. OLERUD S., DANCKWARDT-LILLIESTRÖM G.: Fracture healing in compression osteosynthesis in the dog. J. Bone Joint. Surg. 50B, 844. 1968.
345. OLERUD S., LORENZI L.: Triple fluorochrome labeling in bone formation and resorption. J. Bone Joint Surg. 52A, 274. 1970.
346. OLERUD S., DANCKWARDT-LILLIESTRÖM G.: Fracture healing in compression osteosynthesis. Acta Orthop. Scand. suppl. 137. 1971.
347. OSTROWSKY K., WLODARKI K.: Induction of heterotopic bone formation. En Bourne edit. The biochemistry and physiology of bone. III, 299, Academic Press, 1972. London.
348. PARADIS G.R., KELLY P.J.: Blood flow and mineral deposition in canine tibial fractures. J. Bone Joint. Surg. 57A, 220. 1975.

349. PARTSCH F., BILLICH H.: Experimentelle untersuchungen über das verhalten des vitalfärbaren zellen bei der Kallus-bildung. Arch. Klin. -- Chir. 147, 220. 1928.
350. PENTTINEN R.: Biochemical studies on fracture healing in the rat. Acta Chir. Scand. suppl. 432. 1972.
351. PENTTINEN, NIINIKOSKI S., KULONEN E.: Hyperbaric oxigenation and fracture healing. Acta Chir. Scand. 138, 39. 1972.
352. PERREN S.M., HUGGLER A., RUSSEBERGER, ALLGÖWER M., SCHENK R., WILLENER GER H., MÜLLER M.E.: Cortical bone healing. Acta Orthop. Scand. Suppl. 125. 1969.
353. PIEKARSKI K., WILEY A.M., BARTELS : The effect of delayed internal fixation on fracture healing. Acta Orthop. Scand. 40, 543. 1969.
354. PIZZETTI M., PAVETTO G.C., SILINQUINI P.C., POLI N.: Richerche sperimentali sulle osteosintesi. Min. Ortop. 18, 134, 703, 709, 714, 723. 1967.
355. POST R.H., HEIPLE K.G., CHASE S.W., HERNDON C.H.: Bone grafts in diffusion chambers. Clin. Orthop. 44, 266. 1966.
356. PRASARD G.C., REYNOLDS J.J.: Effect of environment factors on the repair of bone. J. Bone Joint. Surg. 50B, 401. 1968.
357. PRASARD G.C., UDUPA K.N.: Studies on ultrastructural pattern of osteogenic cells during bone repair. Acta Orthop. Scand. 43, 163. 1972.
358. PURANEN J.: Reorganization of fresh and preserved bone trasplants. Acta Orthop. Scand. suppl. 92. 1966.
359. PURANEN J, KASKI P.: The clinical significance of osteomedullography in fractures of the tibial shaft. J. Bone Joint. Surg. 56A, 759, - 1974.
360. PUTTE K., URIST M.R.: Osteogenesis in the interuir of intramuscular implants of decalcified bone matrix. Clin. Orthop. 43, 257. 1966.
361. RAHN B.A., GALLINARO P., BATTENSBERGER A., PERREN S.M.: Primary bone healing J. Bone Joint. Surg. 53A, 783. 1971.
362. RAY R.D.: Osteogenesis and treatement of delayed union and non union of long bones. 8º Congreso S.I.C.O.T., New York, 1960.
363. RAY R.D., SABET T.: Bone grafts. Cellular survival versus induction. J. Bone Joint. Surg. 45A, 337. 1963.
364. RAY R.D., AOUAD R., KAWABATA M.: Experimental study of peripheral circulation and bone growth Clin. Orthop. 52, 221. 1967.

365. RAY R.D., KAWABATA M., GALANTE J.: Experimental study on peripheral circulation and bone growth. III. Clin. Orthop. 54, 175. 1967.
366. REYNOLDS F.C., KEY A.: Fracture healing after fixation with standard plates, contact splint and medullary nails. J. Bone Joint. Surg. - 36A, 577. 1954.
367. RHINELANDER F.W., PHILLIPS R.S.: Microangiography in bone healing.II J. Bone Joint. Surg. 50A, 643. 1968.
368. RHINELANDER F.W., BARAGRY R.: Microangiography in bone healing I. J. Bone Joint. Surg. 44, 1273. 1972.
369. RHINELANDER F.W.: Circulation of bone. En Bourne: The biochemistry - and physiology of bone II, 2. 1972. Academic Press. London.
370. RIESS E.: Experimentelle studien über die knochenbildende kraft des periostes. Arch. Klin. Chir. 129, 750. 1924.
371. ROASENDA F., LORENZI G.L.: Moderni orientamenti nel trattamento con osteosintesi delle fracture diafisarie. 54 Congresso Soc. Ital. Ortop. Roma 1969.
372. ROHDE E.: Beiträge zur frage der metaplasie des bindegewebes in knochen. Arch. Klin. Chir. 128, 302. 1924.
373. ROSE G.G., SHINDLER T.: The cytodifferentiation of osteoblasts in tissue culture. J. Bone Joint. Surg. 42A, 458. 1960.
374. ROTHMAN R.H., KLENEK J., TOLOK J.J.: The effect of iron deficiency -- anemia on fracture healing. Clin. Orthop. 77, 276. 1971.
375. SALOMON C.D., VOLPIN G.: The effects of calcium deficient diet on -- breaking strenght and other physical parameters of rat bones. Clin. Orthop. 82, 207. 1972.
376. SCHENK R., SPIRO, WIENER : Cartilage resorption in the epiphyseal - plate. J. Cell. Biol. 34, 276. 1967.
377. SCHNEIDER E.: Zur biologie der frakturheilung. Arch. Klin. Chir. 144, 689. 1927.
378. SEMB H.: Experimental limb dissuse and bone flow. Acta Orthop. Scand. 40, 552. 1969.
379. SHAW N.E.: Influence of muscle blood flow on the circulation in bones. Proc. Roy. Soc. Med. 58, 877. 1965.
380. SHAW J.J., BASSETT C.A.L.: The effects of varying oxygen concentrations on osteogenesis and embryonic cartilage. in vitro. J. Bone Joint Surg. 49A, 73. 1967.

381. SIFFERT R.S.: Experimental bone trasplants. J. Bone Joint. Surg. 37A, 742. 1955.
382. SIFFERT R.S., BARASH E.S.: Delayed bone trasplantation. An experimental study of early host-trasplant relationships. J. Bone Joint. -- Surg. 43A, 407. 1961.
383. SIMS F.H., KELLY P.J.: Relationship of bone remodeling, oxygen consumption, and blood flow in bone. J. Bone Surg. 52A, 1377. 1970.
384. SLÄTIS P., ROKKANEN P.: The normal repair of experimental fractures. I. Acta Orthop. Scand. 35, 24. 1964.
385. SLÄTIS P., ROKKANEN P.: The normal repair of experimental fractures. II. Acta Orthop. Scand. 36, 221. 1965.
386. STERN B., GLIMCHER M.J., GOLDHABER P.: Effects of various oxygen tensions on synthesis and degradation of bone collagen in tissue culture. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 121, 869. 1966.
387. STRÖMBERG L.N.E.: Diaphyseal bone in rigid internal plate fixation. - Acta Chir. Scand. suppl. 456. 1975.
388. TONNA E.A., CRONKITE E.R.: Celular response to fracture studied with tritiated thimidine. J. Bone Joint. Surg. 43A, 352. 1961.
389. TONNA E.A., CRONKITE E.R. : Changes in the skeletal cell proliferative response to trauma concomitant with aging. J. Bone Joint. Surg. 44A, 1557. 1962.
390. TONNA E.A., CRONKITE E.R.: The periosteum. Autoradiographic studies -- on cellular proliferation and transformation utilizing tritiated -- thymidine. Clin. Orthop. 30, 218. 1963.
391. TONNA E.A., CRONKITE E.R.: Skeletal cell labeling following continuos infusion with T<sup>3</sup>. Lab. Invest. 19, 510. 1968.
392. TONINO A.J., DAVIDSON C.L., KLOPPAR P.J., LINDAU L.A.: Protection -- from stress in bone and its effects. J. Bone Joint. Surg. 58B, 107. 1976.
393. TORTO P.: Il callo osseo normale e patologico. Aspetti istologici. 40 Congresso Soc. Ital. Ortop. Roma 1955.
394. TRIEBEL H.: Knochentransformatiom, in neur auffasung, Arch. Klin. Chir. 120, 526. 1922.
395. TRUETA J.: Regeneration of bone and cartilage. XV Congreso de la Soc. Intern. Chir. Lisboa. 1953.
396. TRUETA J., CAVADIAS A.X.: Vascular changes caused by the Kúntscher type of nailing. J. Bone Joint. Surg. 37B, 492. 1955.



397. TRUETA J., MORGAN J.D.: The vascular contribution to osteogenesis. I, Studies by the injection method. J. Bone Joint. Surg. 42B, 97. 1960.
398. TRUETA J.: The role of the vessels in osteogenesis. J. Bone Joint. -- Surg. 45B, 402. 1963.
399. TRUETA J.: The dynamics of bone circulation. En Frost. edit. Bone Byo dynamics. 245, Little Brown, 1964.
400. UDUPA K.N., PRASARD G.C.: Chemical and histochemical studies on the - organic constituents in fracture repair in rats. J. Bone Joint. - - Surg. 45A, 770. 1963.
401. UHTHOFF H.K., DUBUC F.L.: Bone structure in the dog under rigid inter nal fixation. Clin. Orthop. 81, 165. 1971.
402. URIST M.R., WALLACE T.H., ADAMS T.: The function of fibrocartilagi - nous fracture callus. J. Bone Joint. Surg. 47B, 304. 1965.
403. URIST M.R., SILVERMAN B.F., BÜRING K., DUBUC F.L., ROSEMBERG J.: The bone induction principle. Clin. Orthop. 53, 243. 1967.
404. URIST M.R., STATES B.S.: Bone formation in implants of partially and wholly demineralized bone matrix. Clin. Orthop. 71, 271. 1969.
405. VARMA B.P., METHA S.H.: Fracture healing with intramedullary nail. Ac ta Orthop. Scand. 38, 419. 1967.
406. WILlich C.T.: Experimentelles über knochenregeneration und pseudoarthro senbildung. Arch. Klin. Chir. 129, 203. 1924.
407. WILKINSON : Use of radiophosphorus in fractured bones. Surg. Gyn. Obst.
408. WRAY J.R.: edit. Circulation and the skeletal system. A.A.O.S. J. Bo ne Joint. Surg. 50A, 764. 1968.
409. WRAY J.R.: The effect of age on the vascular response to trauma. J. - Trauma 1, 576. 1961.
410. YAMAGISHI M., YOSHIMURA Y.: The biomechanics of fracture healing. J. Bone Joint. Surg. 37A, 1035. 1955.
411. YOUNG M.H.: The repair of experimental defects in rabbit skulls. J. - Bone Joint. Surg. 46B, 329. 1964.
- 411 A YOUNG M.H.: Bone and derivatives of bone repair of skeletal defects. -- Clin. Orthop. 50, 257. 1967.
412. ZUCMAN J.: L'elaboration du cal dans les fractures diaphysaires. Rev. Chir. Orthop. 52, 109. 1966.

413. ZUCMAN J., MAURER P., BERBESSON C.: Etude experimentale de l'action -  
osteogenique des greffes de perioste, de moelle osseuse et de l'ale  
sage centromedullaire. Rev. Chir. Orthop. 54, 221. 1968.
- 413 B ZUCMAN J., MAURER P., BERBESSON C.: The effect of autografts of bone  
and periosteum in recent diaphysial fractures. J. Bone Joint. Surg.  
50B, 409. 1968.
414. ZUCMAN J., PIKETTY D.: Etude experimentale de l'action des greffes de  
moelle osseuse et d'os dans les fractures diaphysaires recentes - -  
graves. Rev. Chir. Orthop. 56, 3. 1970.

## FENOMENOS ELECTRICOS Y BIOMECANICOS

- 415. ANDERSON J.C., ERIKSSON C.: Piezoelectric properties of dry and wet bone. Nature. 227, 491. 1970.
- 416. ARNOLD G., KOKEMOHR M.: Funktionelle Eigenschaften von Röhrenknochen unter axialer Belastung. Z. Exper. Chirurg. 6, 68. 1973.
- 417. ASCENZI A., BELL G.H.: Bone as a mechanical Engineering problem. En Bourne edit. The biochemistry and Physiology of Bone I, 311, Academic - - Press, 1972.
- 418. ATHENSTAEDT H.: Permanent electric polarization and pyroelectric beha - viour of the vertebrate skeleton. Z.Anat.Entwickl.gesch. 131, 1, 21, - 1970.
- 419. ATHENSTAEDT H.: Permanent longitudinal electric polarization and pyroelec - tric behaviour of collagenous structures and nervous tissue in man and other vertebrates. Nature, 228, 830. 1970.
- 420. BASSET C.A.: Biophysical principles affecting bone structure. En Bourne edit. The biochemistry and physiology of bone III, 1, Academic Press, 1971.
- 421. BASSETT C.A., PAWLUK R.J., PILLA A.A.: Augmentation of bone repair by inductive coupled fields. Science 144, 575. 1974.
- 422. BECKER R.O.: The bioelectric factors in Amphibian limb regeneration. J. Bone Joint.Surg. 43A, 643. 1961.
- 423. BECKER R.O., BASSETT C.A., BACHMAN C.H.: Bioelectric factors controlling bone structure. En Frost. edit. Bone byodinamics. 209, Little, 1964.
- 424. BECKER R.O., BROWN F.M.: Photoelectric effects in human bone. Nature, - 206, 1325. 1965.
- 425. BECKER R.O., BACHMAN C.H., SHAMOS M.H., LAVINE L.S.: Bioelectric effects in tissues. Clin. Orthop. 43, 251. 1966.
- 426. BECKER R.O., MURRAY D.G.: The electrical control system regulating frac - ture healing in amphibians. Clin. Orthop. 73, 169, 1970.
- 427. BECKER R.O.: Stimulation of partial limb regeneration in the rat. Nature, 235, 109. 1972.
- 428. BEHARI J., GUHA K., AGARWAL P.N.: Temperature dependence of the electri - cal conductivity of bone. Connect. tiss. res. 2, 325. 1974.

429. BELLAIRS R.: Cell differentiation y cell growth and morphogenesis. En: The cell in medical science. Academic Press London 1973.
430. BLACK J., KOROSTOFF E.: Piezoelectric phenomena in viable human bone. En 12 Congreso SICOT, Tel-Aviv, 1972, 966, Excerpta Médica.
431. BLAIMONT P., HALLEUX P., JEDWAB J.: Distribution des contraintes osseuses dans le femur. Rev. Chir. Orthop. 54, 303. 1968.
432. BRIGHTON C.T., FRIEDENBERG Z.B., BLACK J.: Effects of applied electrical current in connective tissue. SICOT, 12 Congreso, Tel-Aviv, 1972, 960. Excerpta Médica.
433. BRIGHTON C.T., FRIEDENBERG Z.B., ZEMSKY L.M., POLLIS P.R.: Direct-current stimulation of non-union and congenital pseudoarthrosis. J. - Bone Joint.Surg. 57A, 368. 1975.
434. BROOKES M., WARDLE E.N.: Muscle action and the shape of the femur. J. Bone Joint.Surg. 44B, 398. 1962.
435. BURSTEIN A.H., ZIKA J.M., HEIPLE K.G., KLEIN L.: Contribution of collagen and mineral to the elastic-plastic properties of bone. J. Bone Joint Surg. 57A, 956. 1975.
436. CASTRO F. de.: Quelques observations sur l'intervention du système nerveux autonome dans l'ossification. Trab. Lab. Inv. Biol. Univ. Madrid, 26, 215. 1930.
437. COCHRAN G.B.: Experimental methods for stimulation of bone healing by means of electric energy. Bull. N.Y. Acad.Sci. 48, 899. 1972.
438. CHAMAY A., RICHEZ J., BIELER L.: L'influence des micro-courants électriques sur l'ostéogenèse, Rev. Chir. Orthop. 58, 389. 1972.
439. CHAMAY A., TSCHANTZ P.: Mechanical influences in bone remodeling experimental research on Wolff's law. J. Biomech. 5, 173. 1972.
440. CURREY J.D.: The adaptation of bone to stress. J. Theoret. Biol. 20, 91. 1968.
441. CURREY J.D.: Mechanical properties of bone. Clin. Orthop. 73, 210. - 1970.
442. DIGBY P.S.B.: Mechanism of calcification in mammalian bone. Nature, - 212, 1250. 1966.
443. DIGBY P.S.B.: Potentials and calcification in mammalian teeth and artery. Ann. N.Y. Acad. Sci. y Anast. 438, 202. 1974.
444. EDE D.A., LAW J.T.: Computer stimulation of vertebrate limb morphogenesis. Nature, 231, 244. 1969.

445. ENLOW D.H.: Wolff's law and the factor of architectonic circumstance. Amer.J. Orthodont. 54, 803. 1968.
446. EPKER B.N., FROST H.M.: Correlation of bone resorption and formation with physical behavior of loaded bone. J. Dent. res. 44, 33. 1965.
447. EVANS F.G., VINCENTELLI R.: Relations of the compressive properties - of human cortical bone to histological structure and calcification. J. Biomech. 7, 1. 1974.
448. EVANS F.G.: Stress and strain in bones. Ch. Thomas, Springfield, 1957
449. EVANS F.G.: Mechanical properties of bone. Ch. Thomas, Springfield, - 1973.
450. FRIEDENBERG Z.B., BRIGHTON C.T.: Bioelectric potentials in bone. J. Bone Joint.Surg. 48A, 915. 1966.
451. FRIEDENBERG Z.B., KOHANIM M.: The effect of direct current on bone. - Surg. Gyn. Obst. 127, 97. 1968.
452. FRIEDENBERG Z.B., ANDREWS E.T., SMOLENSKI B.I., PEARL B.W., BRIBHTON G.T.: Bone reaction to varying amounts of direct current. Surg. Gyn. Obst. 131, 894. 1970.
453. FRIEDENBERG Z.B., ROBERTS P.G., DIDIZIAN N.H., BRIGHTON C.T.: Stimula tion of fracture healing by direct current in the rabbit fibula. J. Bone Joint.Surg. 53A, 1400. 1971.
454. FRIEDENBERG Z.B., ZEMSKY L.M., POLLIS R.P., BRIGHTON C.T.: The respon se of non trumatized bone to direct current. J. Bone Joint.Surg. -- 56A, 1023. 1974.
455. FUKADA E., YASUDA I.: On the piezoelectric effect of bone. J. Phys. - Soc. Jap. 12, 1158. 1957.
456. FUKADA E.: Mechanical deformation and electrical polarization in biolo gical substances. Biorheology. 5, 199. 1968.
457. GJELSVIK A.: Bone remodeling and piezoelectricity. J. Biomech. 6, 187, 1973.
458. GLOBUS M., LIVERSAGE R.A.: Nerve dependent regeneration in vitro. J. Embryol. exp.morph. 33, 813. 1975.
459. HALL B.K.: Histogenesis and morphogenesis of bone. Clin. Orthop. 74, 249. 1971.
460. JANSEN M.: On bone formation. Manchester University press. 1920.
461. JORGENSEN T.E.: The effect of electric current on the healing time of crural fractures. Acta Orthop.Scand. 43, 421. 1972.

462. JUSTUS R., LUFT J.H.: A mechanochemical hypothesis for bone remodeling induced by mechanical stress. *Cal. Tiss. res.* 5, 22. 1970.
463. LANDRY M., FLEISCH H.: The influence of immobilisation on bone formation. *J. Bone Joint. Surg.* 46B, 764. 1964.
464. LANYON L.E., SMITH R.N.: Bone strain in the tibia during normal quadrupedal locomotion. *Acta Orthop. Scand.* 41, 238. 1970.
465. LANYON L.E.: Experimental support for the trajectorial theory of bone structure. *J. Bone Joint. Surg.* 56B, 160. 1974.
466. LANYON L.E., HAMPSON W.G., GOODSHIP A.E., SHAR J.S.: Bone deformation recorded in vivo from strain attached gauges to the human tibial shaft. *Acta Orthop. Scand.*, 46, 256. 1975.
467. LAVINE L.S., LUSTRIN I., SHAMOS M.H., MOSS M.L.: The influence of electric current on bone regeneration in vivo. *Acta Orthop. Scand.*, 42, - 305. 1971.
468. LAVINE L.S., LUSTRIN I., SHAMOS M.H., RINALDI R.S., LIBOFF A.R.: Electric enhancement of bone healing. *Science.* 175, 1118. 1972.
469. LOTKE P.A., BLACK J., RICARDSON S.: Electromechanical properties of human articular cartilage. *J. Bone Joint. Surg.* 56 A, 1040. 1974.
470. MAROUDAS A.: Physicochemical properties of cartilage in the light of ion exchange theory. *Biophys. J.* 8, 575. 1968.
471. MC ELHANEY J.H.: The charge distribution on the human femur due to load. *J. Bone Joint. Surg.*, 49A, 1561. 1967.
472. MILGRAM J.W., ROBINSON R.A.: Electron microscopic demonstration of unmyelinated nerves in the haversian canals of adult dog. *Bull. J. Hopkins Hosp.* 117, 163. 1965.
473. MINKIN C., POULTON B.P., HOOVER W.H.: The effect of direct current on bone. *Clin. Orthop.* 57, 303. 1968.
474. MITTELMEIER H.: Piezoelektrische und spannungsoptische untersuchungen zur biomechanik der Schraubenosteosynthese. *Z. Orthop.* 110, 893, - 1972.
475. PEUWELS F.: *Gesammelte abhandlungen.* Springer 1975.
476. PAUWELS F.: *Atlas zur biomechanik der gesunden und kranken Hüfte.* Springer. 1973.
477. PAUWELS F.: Kurzer überblick über die mechanische Beanspruchung des knochens. *Z. Orthop.*, 111, 681. 1973.

478. POPESCU M., SGARBORA I, DENISCHI A.: Experimental research on the piezoelectric properties of bone. S.I.C.O.T. 12 Congreso Tel-Aviv 1972. 962, Excerpta Médica.
479. -POPE M.H., MURPHY M.C.: Fracture energy of bone in a shear mode. Med. Biol. Engin., 12, 763. 1974.
480. RABISCHONG P., AVRIL J.: Role biomechanique des poutres composites os-muscles. Rev. Chir. Orthop. 51, 437. 1965.
481. RADIN E.L., PUGH J.W., STEINBERG R.S.: Trabecular microfractures in response to stress. S.I.C.O.T., 12 Congreso Tel-Aviv, 1972. 59, Ex -cerpta Médica.
482. REILLY D.T., BURSTEIN A.H.: The mechanical properties of cortical bone. J. Bone Joint.Surg. 56A, 1001. 1974.
483. REINISH G., NOWICK A.S.: Piezoelectric properties of bone as function of moisture content. Nature, 253, 626. 1975.
484. RICHEZ J., CHAMAY A., BIELER L.: Bone changes due to pulses of direct electric microcurrent. Virch.Arch.Path.Anat., 357, 11. 1972.
485. ROSE S.M., ROSE F.C.: Electrical studies on normally regenerating, on X-rayed and on denervated limb stumps. Growth , 38, 363. 1974.
486. SCOTT J.H.: The mechanical basis of bone formation. J.Bone Joint.Surg. 39B, 134. 1957.
487. SEDEL L.: Propietes mecaniques de l'os. Rev.Chir.Orth. 60, 643. 1974.
488. SEDLIN E.: A rheological model for cortical bone.Acta Orthop.Scand. su ppl. 83. 1965.
489. SHAMOS R.H., LAVINE L.S.: Physical bases for bioelectric effects in mineralized tissues. Clin. Orthop., 35, 177. 1964.
490. SHERMAN M.S.: The nerves of bone. J. Bone Joint.Surg. 45A, 522, 1963.
491. STEINBERG M.E., BUSENKELL G.L., BLACK J., KOROSTOFF E.: Stress induced potentials in moist bone. J. Bone Joint.Surg. 56A, 704. 1974.
492. WEIGERT M., WERHAHN C., MELLEROWICZ H., BANDOW R.: Stimulation of longi tudinal groeth and fracture healing by electric current. S.I.C.O.T. - 12 Congreso Tel-Aviv 1972. 546, Excepta Médica.
493. WEIGERT M.: Knochepotentiale bei elektrische stimulation. Z. Orthop. -- 111, 778. 1972.
494. WEIGERT M.: Anregung der knochenbildung durch elektrischen strom. Springer 1973.

- 495. WERHAHN C., WEIGERT M.: Die Stiemulierung der primären knochenheilung durch elektrischen Gleichstrom. A. Orthop., 112, 1226. 1974.
- 496. WILSON L.: Experimental attempts to stimulate bone growth. J. Bone -- Joint Surg. 52A, 1033. 1970.
- 497. WOLPERT L.: IPositional Information and the spatial pattern of cellular differentiation. J. Theoret. Biol., 25, 1. 1969.
- 498. MARINO A.A., BECKER R.O.: Piezoelectricity and autoinduction. Clin. -- Orthop. 100, 247. 1974.